

In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful



Copyright disclaimer

"La faculté" is a website that collects medical documents written by Algerian assistant professors, professors or any other health practicals and teachers from the same field.

Some articles are subject to the author's copyrights.

Our team does not own copyrights for some content we publish.

"La faculté" team tries to get a permission to publish any content; however , we are not able to contact all authors.

If you are the author or copyrights owner of any kind of content on our website, please contact us on: facadm16@gmail.com to settle the situation.

All users must know that "La faculté" team cannot be responsible anyway of any violation of the authors' copyrights.

Any lucrative use without permission of the copyrights' owner may expose the user to legal follow-up.



ENZYMOLOGIE

Dr .MA.GHOUALI

1 ère Année Médecine
Année Universitaire 2015-2016

Introduction :

- Le déroulement rapide et efficace des réactions biochimiques doit se faire en présence de **Biocatalyseurs**.
- Certaines protéines sont douées d'activité catalytique spécifique ; il s'agit des **enzymes**.
- Ces dernières occupent une place importante dans le métabolisme intermédiaire en assurant le déroulement ordonné et régulé des processus physiologiques et maintenir leur homéostasie.
- L'étude de la structure, des caractéristiques et de la cinétique des enzymes est indispensable pour la compréhension des activités enzymatiques.

Généralités et Définitions

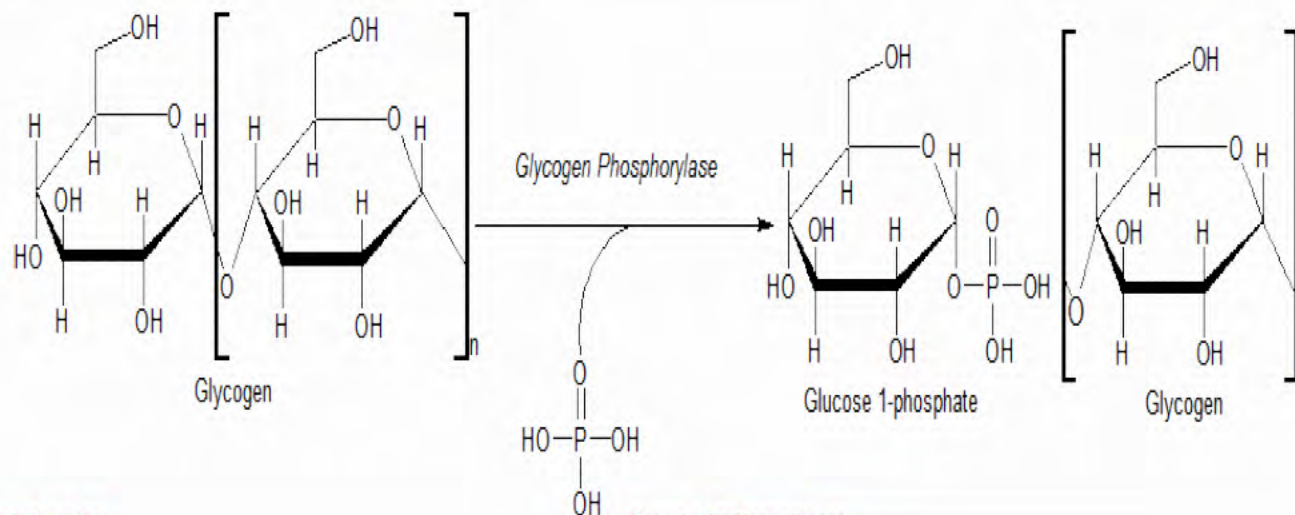
- ❖ **Les enzymes** : pour la plupart d'entre elles des protéines globulaires capables de catalyser des réactions chimiques (**Biocatalyseurs**) dans les conditions compatibles avec la vie (T ,P et concentration)
 - Catalyseurs: agissent a faible concentration et augmentent les vitesses des réactions chimiques de plusieurs ordres de grandeur sans être eux-mêmes modifiés.
 - Biologiques : produits par la cellule, toutes les enzymes sont des protéines sauf les ribozymes (ARN catalytiques)

Généralités et Définitions

- Elles interviennent dans diverses réactions de dégradation, ou de synthèse.

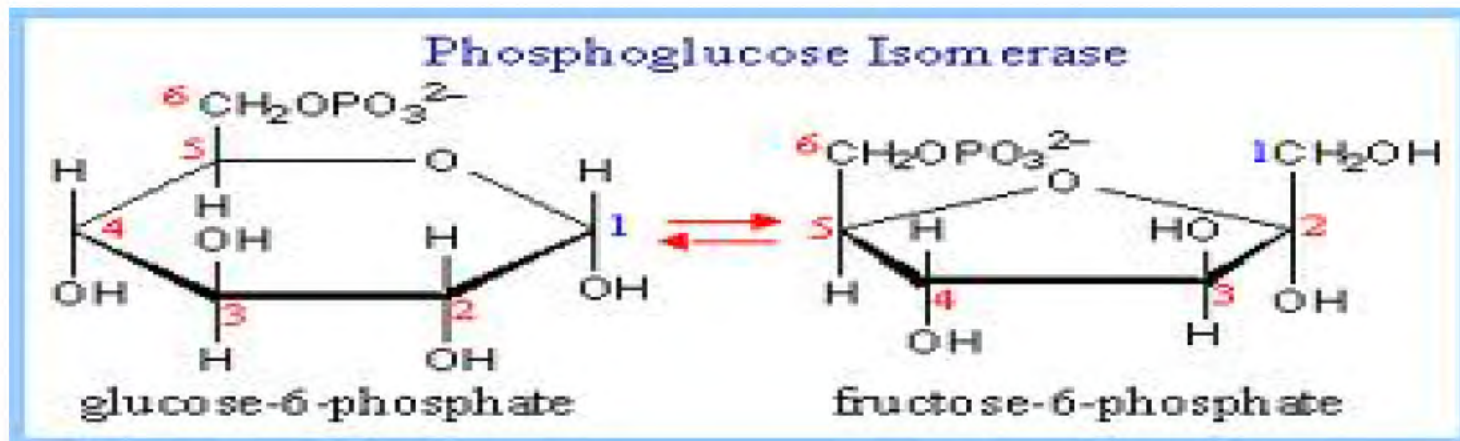
Exemple :

- Phosphorylase** : fixe l'acide phosphorique sur les sucres



Généralités et Définitions

Isomérases : Transforment une molécule en son isomère



Généralités et Définitions

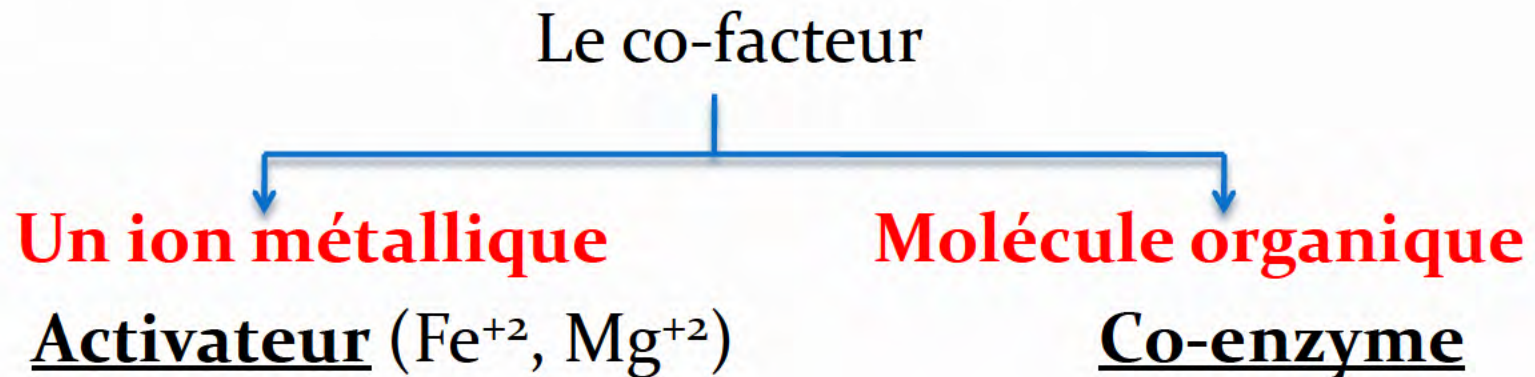
Le substrat: molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme

Généralités et Définitions

❖ Le cofacteur :

Certaines enzymes sont actives par elles mêmes, sans autres groupes fonctionnels ;

D'autres au contraire nécessitent la présence d'un composé non protéique : **Co-facteur**

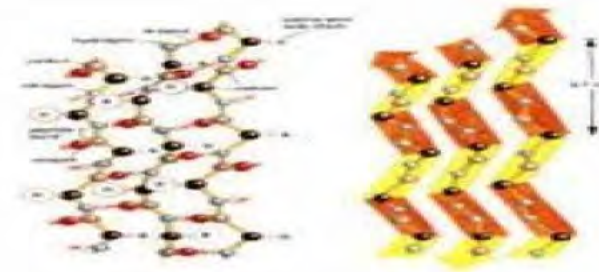
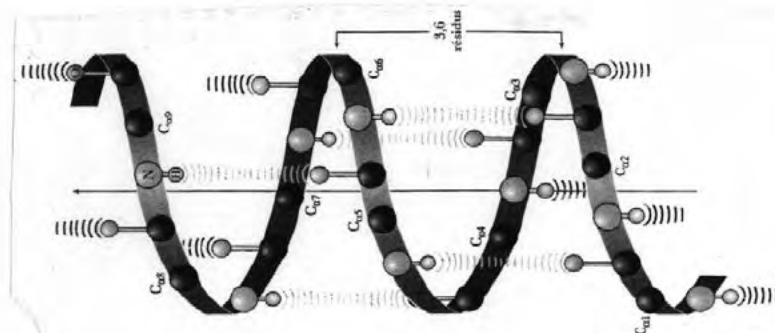


Structure des enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires, elles adoptent plusieurs degrés d'organisation:

Structure des enzymes

- **Structure primaire** : la séquence en acides aminés (AA)
- **Structure secondaire** :
La séquence AA subit des repliements pour former des motifs (**hélices α** et **feuillet β**)

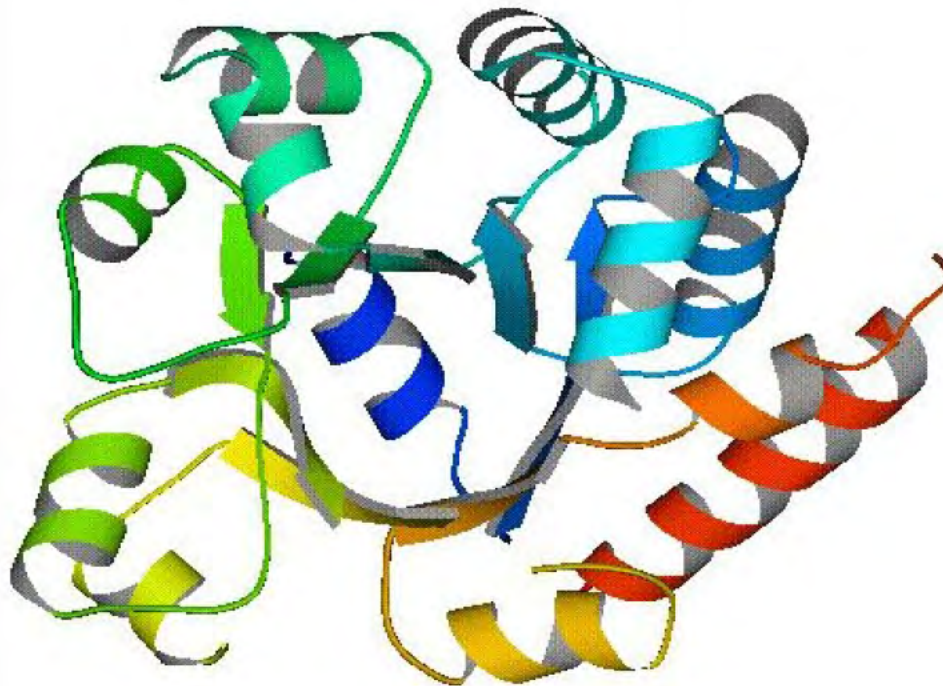


Structure des enzymes

- **Structure tertiaire :**
 - Association de plusieurs motifs, donnant une forme spatiale à la protéine.
 - Cette organisation entraîne une localisation:
 - Des AA **polaires** en surface externe
 - Les AA **non polaires** vers l'intérieur de la molécule (zone hydrophobe interne)
- C'est au niveau de cette zone que se situe **le site actif** d'une enzyme

Structure des enzymes

Pour qu'une enzyme soit **fonctionnelle**, il faut qu'elle adopte une structure tertiaire.



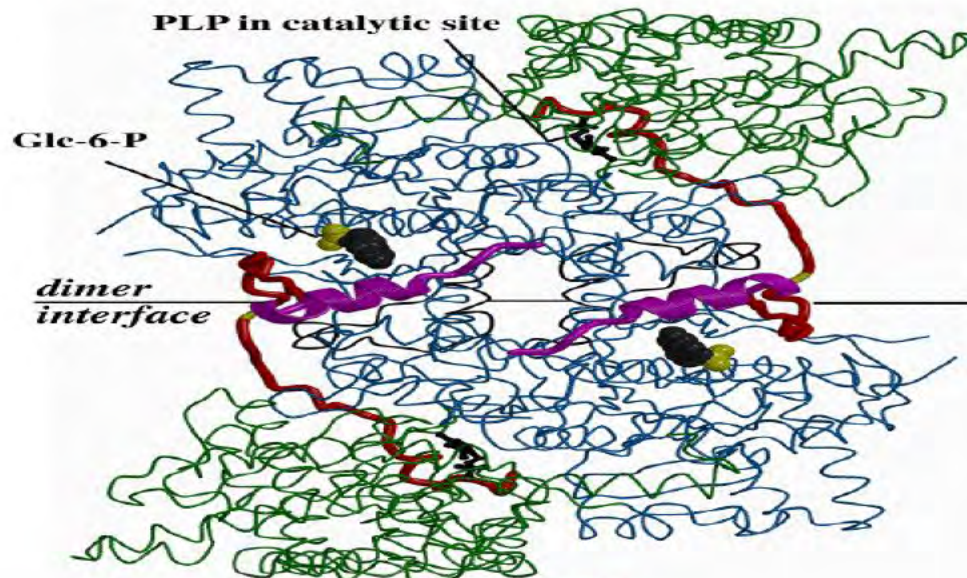
Structure des enzymes

- **Structure quaternaire :**

Association de plusieurs chaines protéiques

- Une chaine : monomère
- Plusieurs chaines : oligomère

Cette structure est adoptée par les **enzymes régulatrices**





Propriétés générales des enzymes

Les enzymes possèdent
des caractéristiques
qui les rendent
uniques

Propriétés générales des enzymes

1- Propriétés d'un catalyseur chimique :

-  la vitesse d'une réaction (mais ne provoque pas de réaction, ou rend possible une réaction qui ne l'est pas sur le plan thermodynamique ($\Delta G < 0$)).
-  l'énergie d'activation.
- Se trouve intacte à la fin de la réaction.
- Au cours des réactions chimiques réversibles, le catalyseur accélère de la même manière les 2 vitesses de réaction évoluant simultanément en sens inverse.
- Il ne modifie pas l'équilibre final de la réaction

Propriétés générales des enzymes

Toutes ces caractéristiques sont applicables aux enzymes, mais les enzymes sont **plus efficaces** que les catalyseurs

- Elles agissent à très faible concentration
- Elles abaissent l'énergie d'activation d'une manière plus importante qu'un catalyseur

Propriétés générales des enzymes

2- Nature protéique :

Toutes les enzymes sont des protéines sauf les ribozymes

Propriétés générales des enzymes

3- **Spécificité des enzymes** : hautement spécifiques, on distingue :

➤ **Spécificité de substrat** :

- La spécificité de substrat est variable, certaines enzymes ont une spécificité **absolue** ; transformant un substrat unique en un produit unique

Propriétés générales des enzymes

Exemple :

Glucokinase : phosphoryle que le glucose

- D'autres ont une spécificité **plus large**, transformant le substrat d'une classe de substrat en autant de produits

Hexokinase : phosphoryle divers hexoses, dont le glucose

Propriétés générales des enzymes

➤ Spécificité d'action :

Une enzyme \longrightarrow Une seule réaction catalysée

- **Kinases** : Ne catalysent que les réactions de phosphorylation en présence d'ATP
- **Décarboxylases** : catalysent la décarboxylation des molécules contenant un groupement carboxyle

Propriétés générales des enzymes

4- Régulation de leurs activités catalytique:

L'activité d'une enzyme est contrôlée par des modulateurs :

- Les activateurs augmentent l'activité.
- Les inhibiteurs la diminuent.

➡ Ajuster la vitesse globale d'un métabolisme aux besoins cellulaires

- Exemple:

La phosphofructokinase : activée par l'AMP
inhibée par l'ATP.

Cette modulation active ou inhibe la glycolyse selon que la charge énergétique est faible ou élevée.

Classification des enzymes

La commission des enzymes et l'union internationale en biochimie a établi une classification et une nomenclature systématique, comportant :

- **6 classes**
- Chacune subdivisée en **sous classes**

Classification des enzymes

- 1) **Oxydoréductase** : oxydoréduction
- 2) **Transférase** : simple transfert
- 3) **Hydrolase** : hydrolyse
- 4) **Lyase** : addition sur une double liaison
- 5) **Isomérase** : inter conversion d'isomères
- 6) **Ligase ou synthétase** : création de liaisons (C-C / C-N / C-S)

Classification des enzymes

A chaque enzyme est attribué un numéro à 4 chiffres et un nom systématique qui identifie la réaction catalysée

- 1^{er} chiffre : Classe de l'enzyme
- 2^e chiffre : sous classe de l'enzyme
- 3^e chiffre : sous sous classe de l'enzyme
- 4^e chiffre : groupe

Classification des enzymes

Exp :



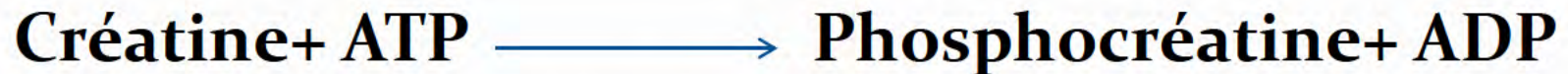
Enzyme :

**ATP glucose Phosphotransférase
(2.7.1.1)**

Classification des enzymes

Cependant d'une manière générale, la dénomination internationale d'une enzyme comprend :

- Nom du substrat
- Celui de la classe de l'enzyme



Enzyme : Créatine phosphotransférase

- Les enzymes qui catalysent le transfert de groupement phosphate sont appelées : **Kinases** → nom classique de l'enzyme : **Créatine kinase**

Classification des enzymes

- **Phosphatases :**

Les enzymes qui coupent le groupement phosphate

- **Phosphorylases :**

Les enzymes qui hydrolysent les liaisons osidiques
et assurent le transfert d'un groupement phosphate

Site actif des enzymes

- Les protéines enzymatiques interagissent avec d'autres molécules protéiques ou non protéiques ; ces molécules sont appelées **ligands**
- Le substrat est un ligand spécifique des enzymes
- Les interactions entre enzyme et substrat font intervenir des liaisons non covalentes :
 - Liaisons hydrogènes
 - Liaisons de Van der waals
- Ces interactions sont des réactions spontanées, et ne nécessitent aucune énergie.

Site actif des enzymes

- Cette interaction fait intervenir :
 - Un phénomène de reconnaissance très spécifique**
 - Un phénomène d'attraction**
- Une protéine dénaturée par la chaleur est incapable de reconnaître son ligand ;
- L'activité enzymatique et la spécificité des enzymes dépendent de l'hélicité et de la conformation spatiale de la protéine.

Site actif des enzymes

Définition :

Le site actif (SA) est une zone privilégiée, qui a la forme d'une cavité, situé dans la zone interne hydrophobe de la protéine,
au niveau de laquelle s'exerce électivement le pouvoir catalytique de l'enzyme.

Site actif des enzymes

Il est subdivisé en 2 parties :

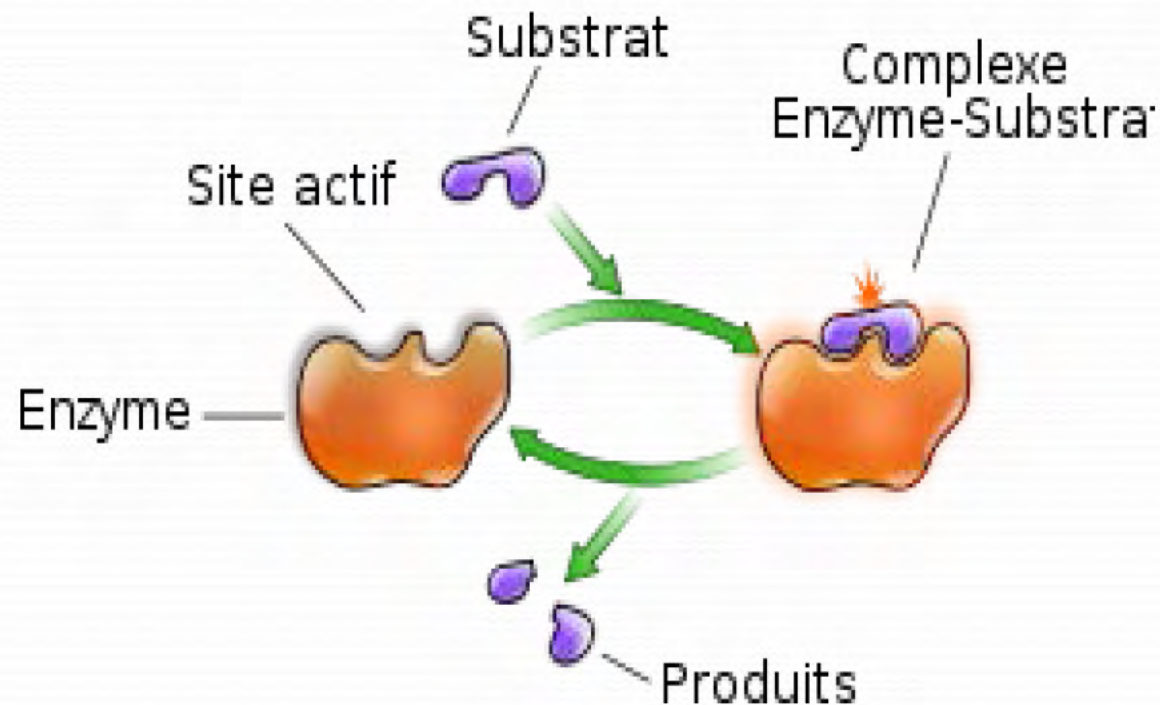
- **Site de liaison, fixation, et reconnaissance :**

Reconnait la complémentarité de forme avec un substrat spécifique de l'enzyme

- **Site catalytique :**

Permet la réaction transformant le substrat en produit

Site actif des enzymes



Site actif des enzymes

Il comprend 3 types d'acides aminés :

1- Acides aminés contributeurs :

Permettent à la protéine enzymatique d'adopter une conformation spatiale pour que le ligand puisse s'y adapter.

2- Acides aminés auxiliaires :

Assurent la mobilité des zones situées au voisinage du centre actif

Site actif des enzymes

3- Acides aminés de contact :

- Lieu de la réaction enzymatique
- Fait intervenir des groupements particuliers de ces AA de contact, qui interagissent avec un ou plusieurs groupements particuliers du substrat.

Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat

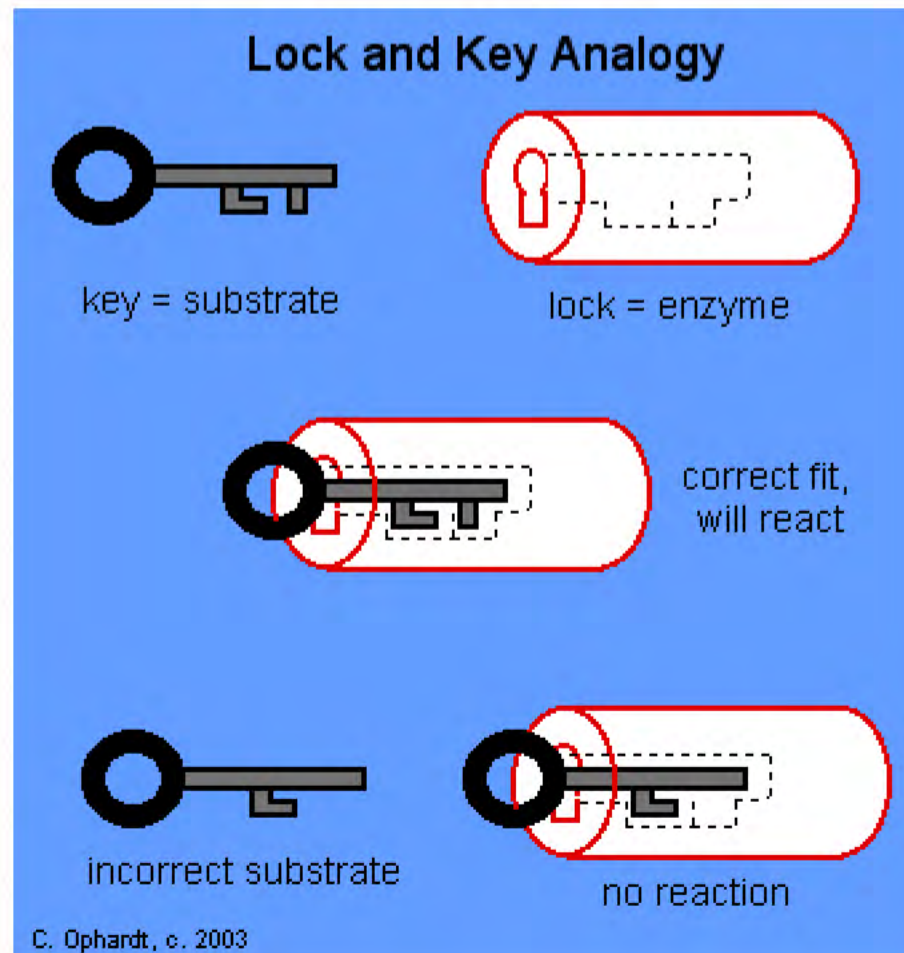
- La réaction enzymatique fait appel à la fixation du substrat au niveau du SA.
- Le SA doit être dans une conformation spatiale de telle sorte que le substrat puisse s'y fixer, il existe **différents modèles**

Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat

1- Modèle de Fisher : Clé-serrure

- Dans ce modèle, la formation du complexe enzyme-substrat **ES** nécessite une interaction entre un ou plusieurs groupes fonctionnels ou domaines du substrat avec des motifs de la cavité enzymatique.
- Ce modèle explique la spécificité de l'enzyme pour son substrat, mais il n'explique pas l'effet des effecteurs

Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat

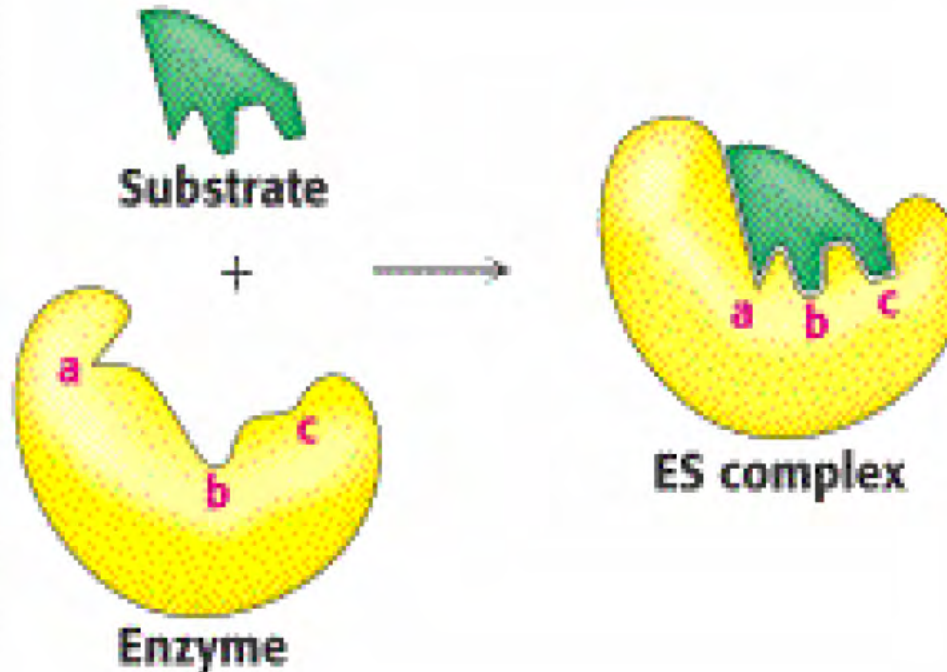


Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat

2- Modèle de Koshland : Ajustement induit

- L'association enzyme-substrat est permise après une modification de la conformation de l'enzyme induite par l'entrée partielle du substrat.

Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat



La Cinétique enzymatique

À

Un substrat

Définition de la cinétique enzymatique

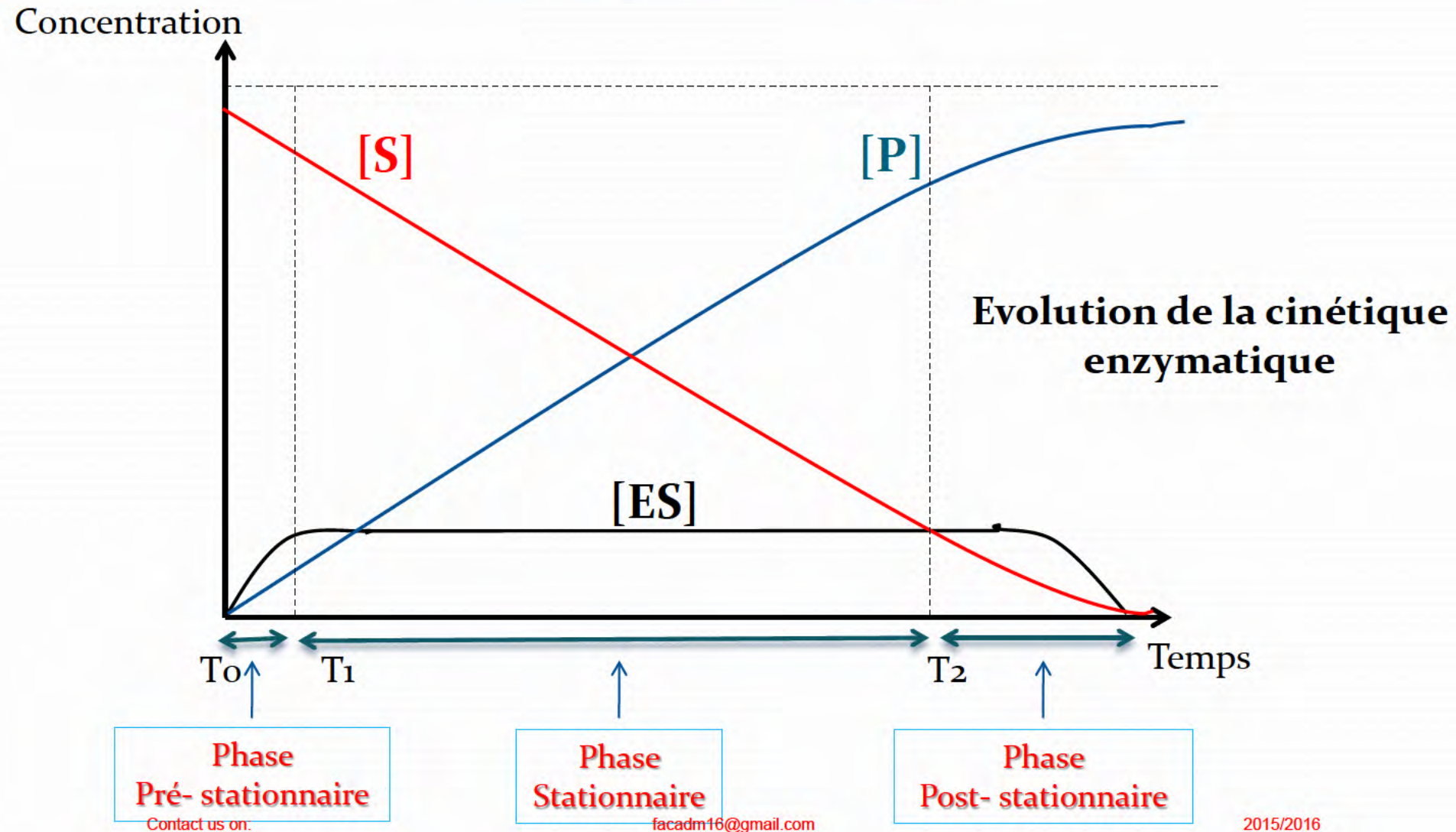
C'est l'étude **de la vitesse maximale** d'une réaction catalysée par une enzyme et **ses modifications** en réponse aux changements des **conditions environnementales** (des conditions expérimentales)

Définition de la cinétique enzymatique

- Soit la réaction:



Les différentes phases de la réaction enzymatique



Les différentes phases de la réaction enzymatique

Différentes phases	Pré-stationnaire	Stationnaire	Post-stationnaire
Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> - Enzyme mise en présence d'excès de substrat - Combinaison ES très rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - Enzyme saturée par le substrat - Combinaison ES est à concentration maximale Constante - Vitesse de la réaction est constante: Vitesse initiale (Reste constante tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme) 	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de S de manière significative au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme

Les différentes phases de la réaction enzymatique

- Notion d'ordre:

Décrit les variations de la vitesse en fonction de la concentration des réactants

Les différentes phases de la réaction enzymatique

Forte concentration de S : La vitesse de la réaction est indépendante de la concentration en substrat:

Réaction d'ordre 0

Faible concentration de S: La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en substrat:

Réaction d'ordre 1

Travailler en concentration saturante en substrat

Définition de la vitesse d'une réaction enzymatique

S'exprime par:

-La quantité de substrat métabolisé par unité de temps

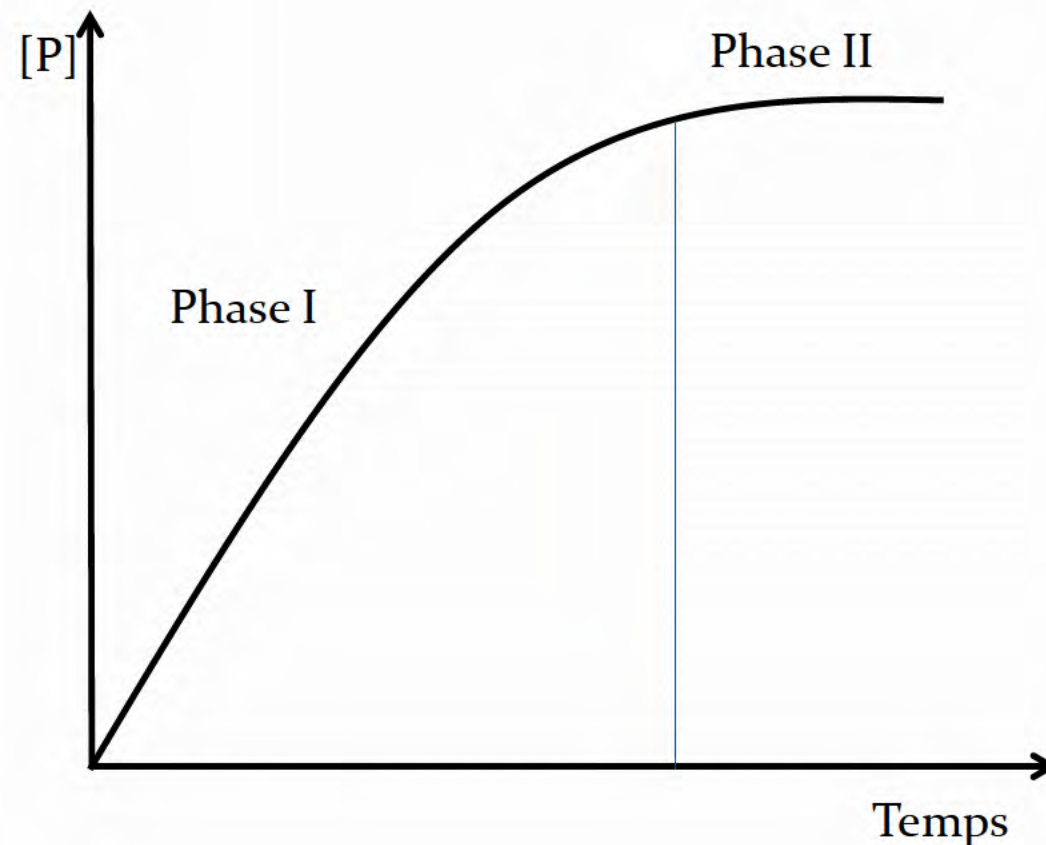
$$V = - dS / dt$$

-Ou par la quantité de produit formé par unité de temps

$$V = dP / dt$$

(Dans les conditions optimales)

Définition de la vitesse d'une réaction enzymatique



Phase I: $v_o = dP/dt$

Phase II:

Inflexion de la droite par:

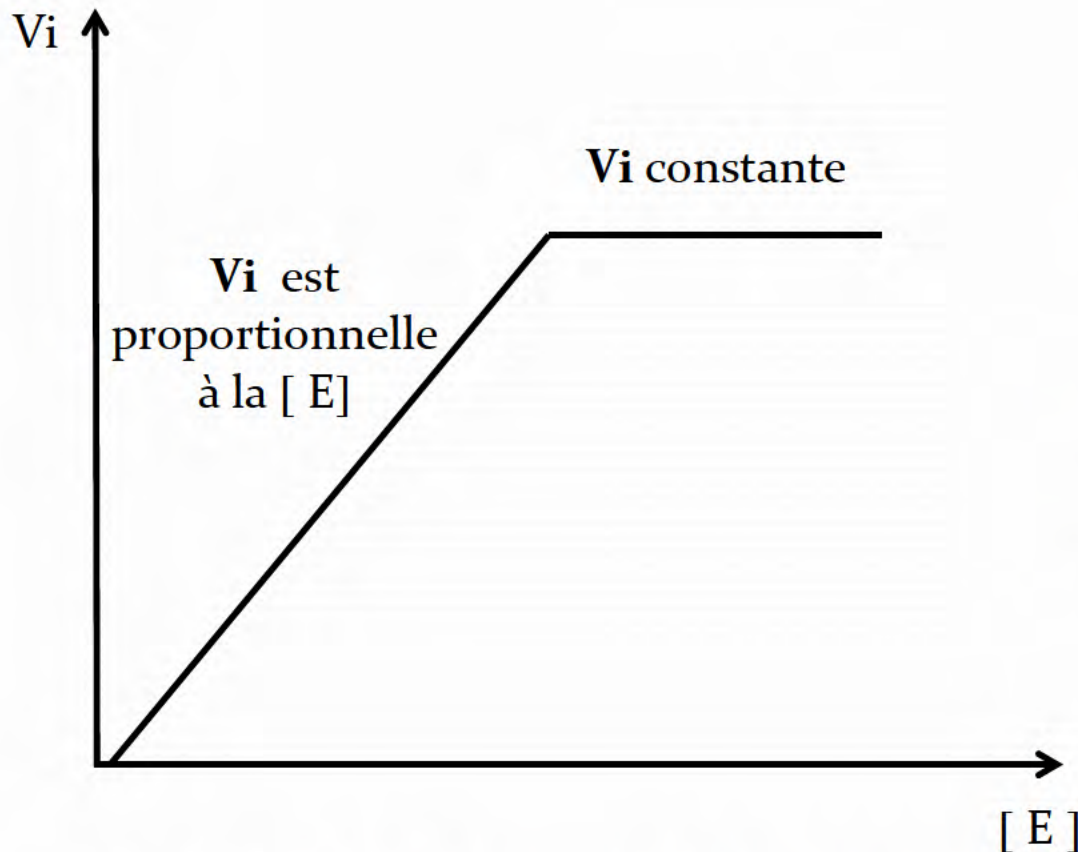
- Epuisement du substrat
- Inactivation de l'enzyme
- Formation d'une grande quantité de produits, susceptible de donner la réaction inverse

Définition de la vitesse d'une réaction enzymatique

Il est indispensable
D'étudier **la vitesse initiale** de réaction dans les conditions
ou la
 $[S] > [E]$

Si le temps de la réaction est très court, la modification de $[S]$ est négligeable, et $[S]$ peut être considéré comme **constante**

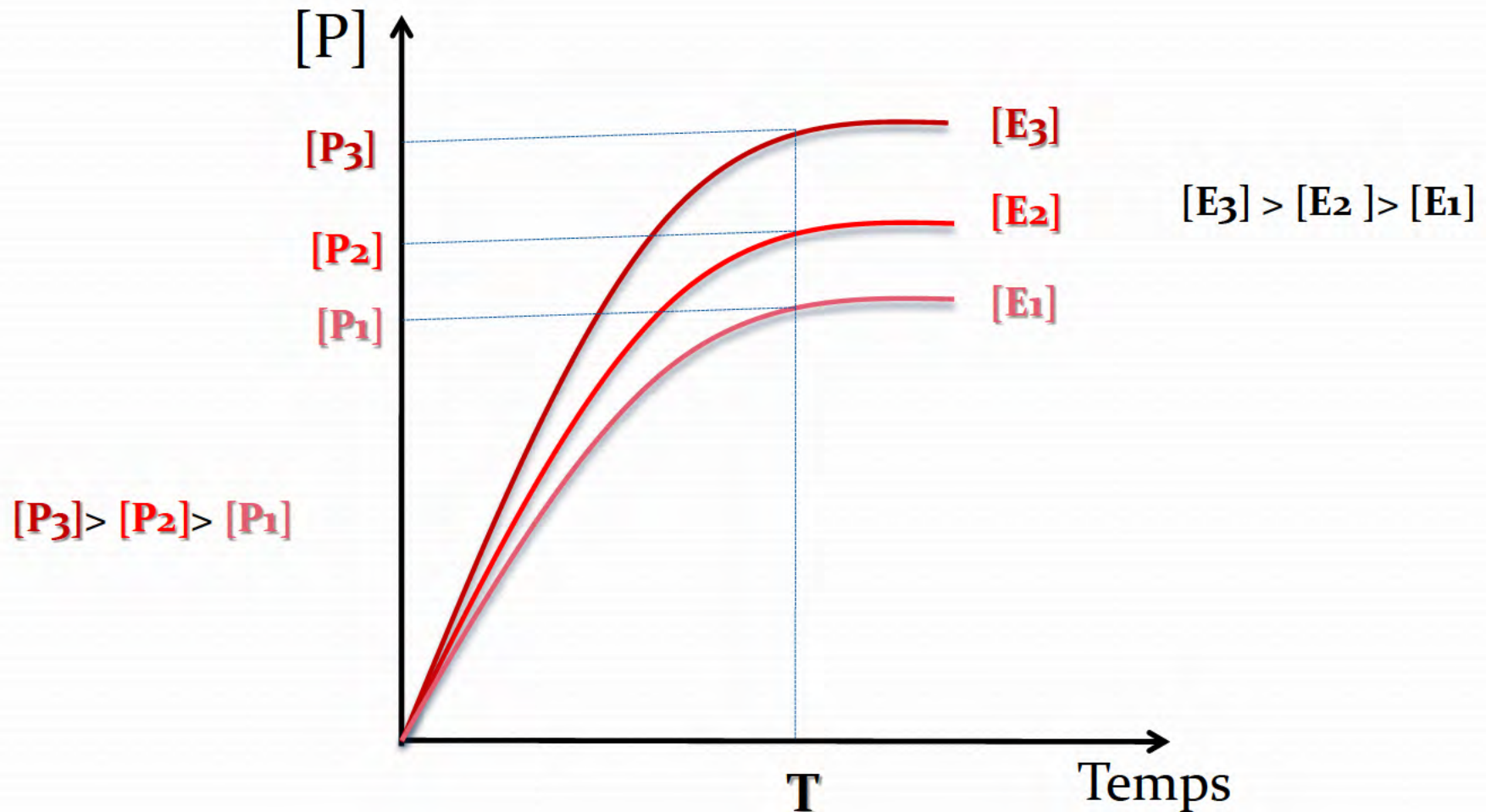
Influence de la [Enzyme] sur la V_i



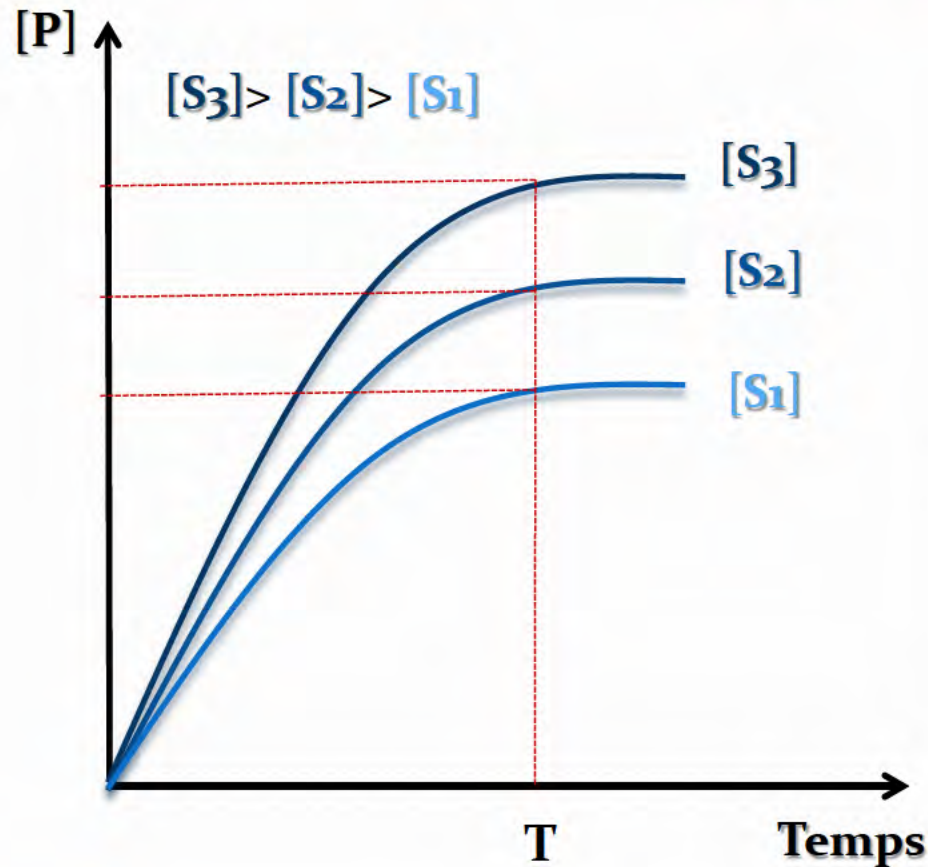
V_i est proportionnelle à la $[E]$ dans un premier temps, puis elle demeure constante pour des concentrations enzymatiques plus élevées

Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat

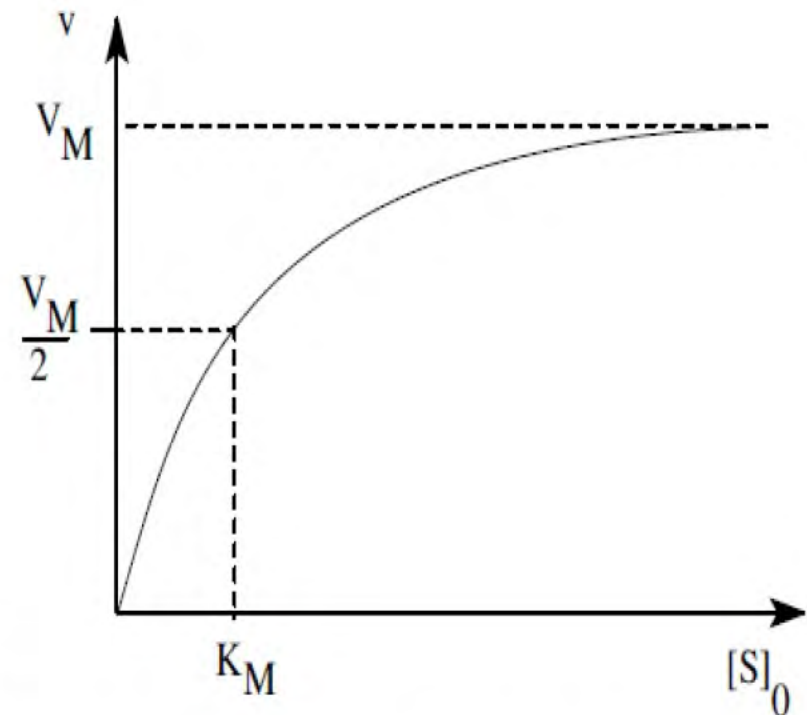
Influence de la [Enzyme] sur la [Produit]



Influence de la concentration croissante du substrat



La concentration du produit formé



La vitesse initiale de la réaction

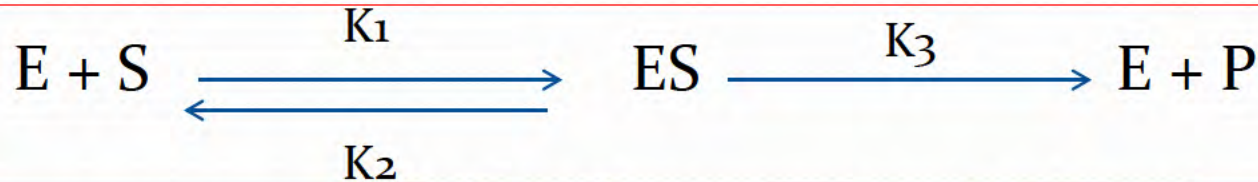
Influence de la concentration croissante du substrat

[S] est saturante

L'enzyme est en pleine activité et tous les sites actifs sont saturés

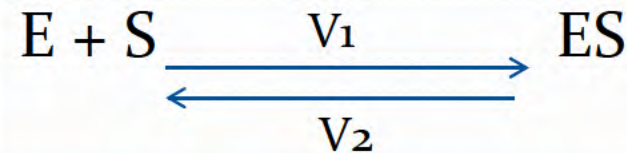
**En pratique,
Détermination d'une activité enzymatique lorsque
[S] est saturante (en excès)**

Hypothèse de Michaelis-Menten



(K_1, K_2 et K_3 = constantes de vitesse)

- Formation du complexe ES:
(Étape rapide et réversible)



- Dissociation du complexe ES:



- Disparition de S
- Apparition de P
- Régénération de E

La constante de Michaelis: Km

- D'après la loi d'action de masse:

$$V_1 = k_1 [E][S] \dots\dots (1)$$

$$V_2 = k_2 [ES] \dots\dots (2)$$

Vitesse d'apparition des produits:

$$dP/dt = V_3 = k_3 [ES] \dots\dots (3)$$

**La vitesse de disparition du substrat est égale à la
vitesse d'apparition du produit**

$$- dS/dt = dP/dt \dots\dots (4)$$

La vitesse de disparition du substrat

$$- dS/dt = V_1 - V_2 \dots\dots (5)$$

La constante de Michaelis

$$V_1 - V_2 = V_3$$

Et selon (1),(2),(3),(4) et (5):

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

$$\frac{k_2 + k_3}{K_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_m$$

K_m: constante de dissociation du complexe ES
= constante de Michaelis

Valeur de K_m est d'autant plus élevée que la:

- dissociation du complexe ES est forte
- Et donc que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est faible

L'équation de Michaelis

[Et]: Concentration de l'E présente dans le système

$$[E] = [Et] - [ES]$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([Et] - [ES])[S]}{[ES]}$$

$$K_m + [S] = \frac{[Et][S]}{[ES]} \quad [ES] = \frac{[Et][S]}{K_m + [S]}$$

V = vitesse de la réaction enzymatique = V_3

$$V = V_3 = k_3 [ES]$$

$$V = \frac{k_3 [Et][S]}{K_m + [S]}$$

L'équation de Michaelis

La vitesse de la réaction dépend de la:

- concentration en enzyme totale
- Concentration en substrat
- De la constante de Michaelis

La vitesse est maximale lorsque [ES] sera la plus grande possible:

Lorsque la totalité de l'enzyme sera combinée au substrat

$$[Et] = [ES] \longrightarrow V_m = K_3 [Et]$$

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

Interprétation et intérêts

1- $V = \frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_m}{K_m + [S]}$

$K_m = [S]$ lorsque la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse max

2- Quand la concentration initiale en substrat est très supérieure à K_m (K_m négligeable)

$$V_i = V_m = k_{\text{cat}}[E_t]$$

(k_{cat} est l'efficacité catalytique)

3- Quand la concentration initiale en substrat est très inférieure à K_m ($[S]$ négligeable)

$$V_i = k_{\text{cat}} / K_m \cdot [E_t][S]$$

k_{cat}/K_m : la constante de spécificité

Interprétation et intérêts

K_m est fonction des constantes de vitesse de chacune des étapes de la catalyse:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

Si $k_2 > k_3$: dissociation de ES est plus rapide que la formation de E et P

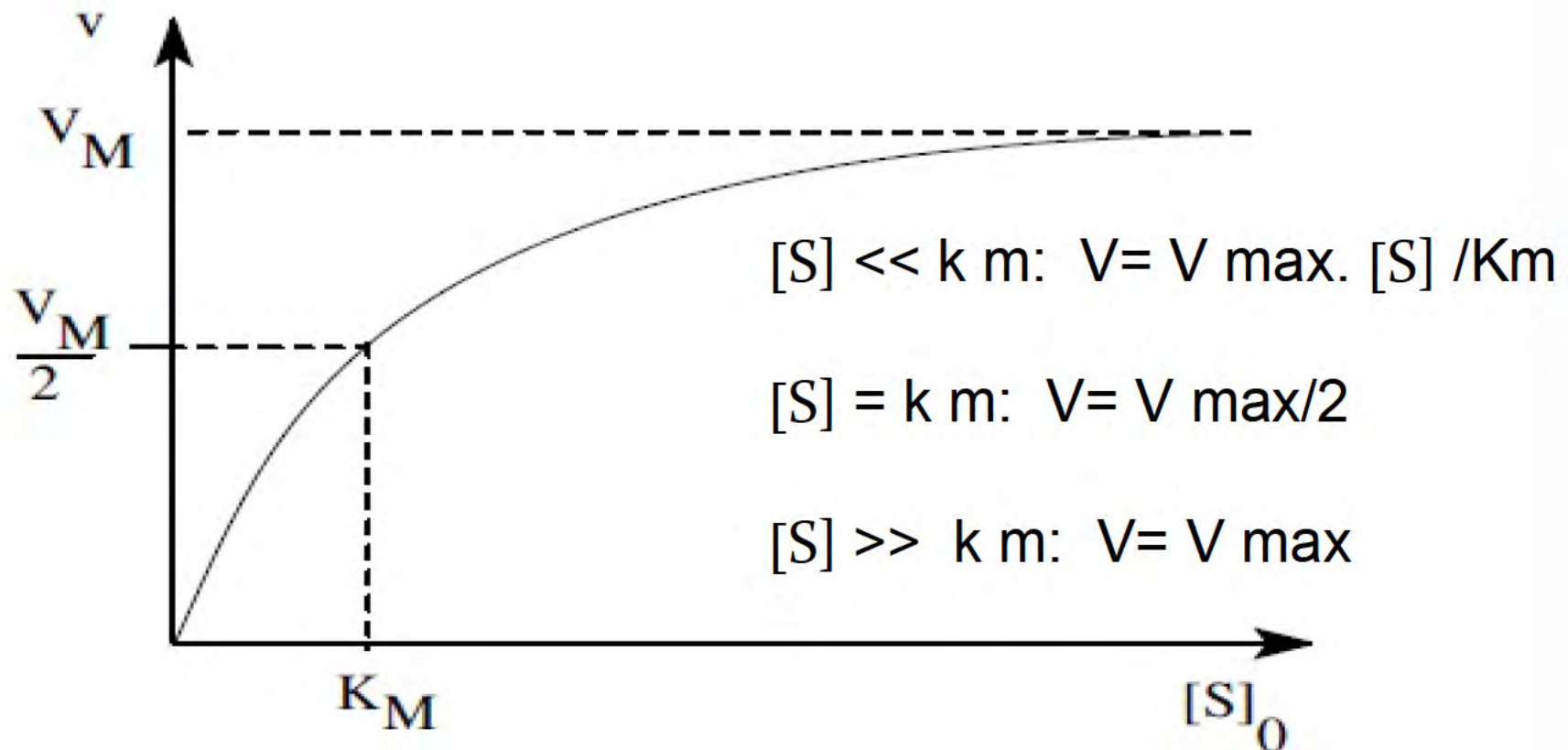
$$K_m = k_2/k_1 = \text{constante de dissociation } K_s$$

K_m : mesure de la stabilité du complexe ES

K_m élevé: liaison faible

K_m faible : liaison forte

Interprétation et intérêts



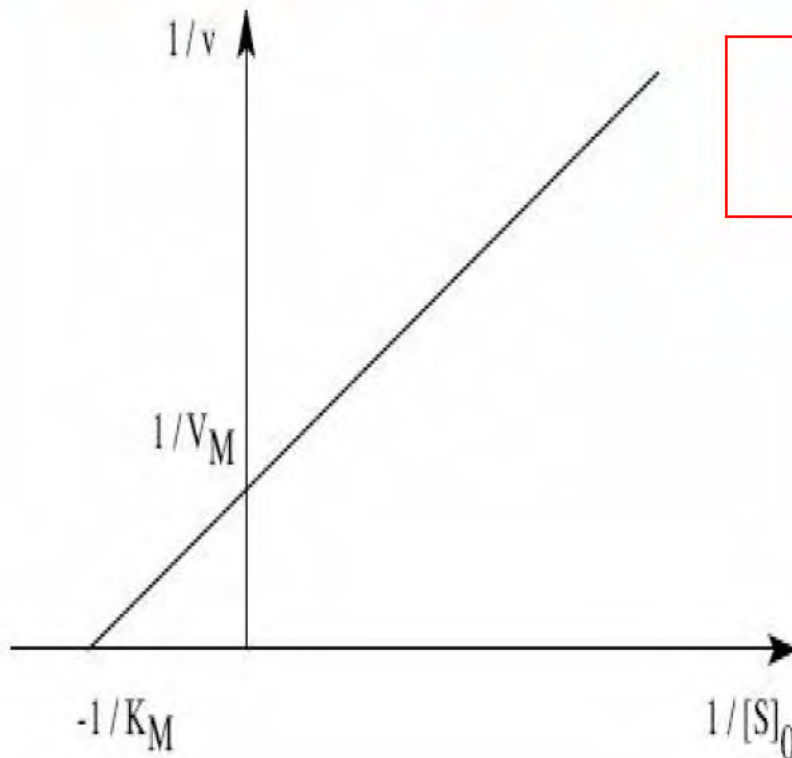
Méthode de détermination de la constante de Michaelis

1- Méthode arithmétique:

$$V = V_{\max}/2 \quad K_m = [S]$$

Méthode de détermination de la constante de Michaelis

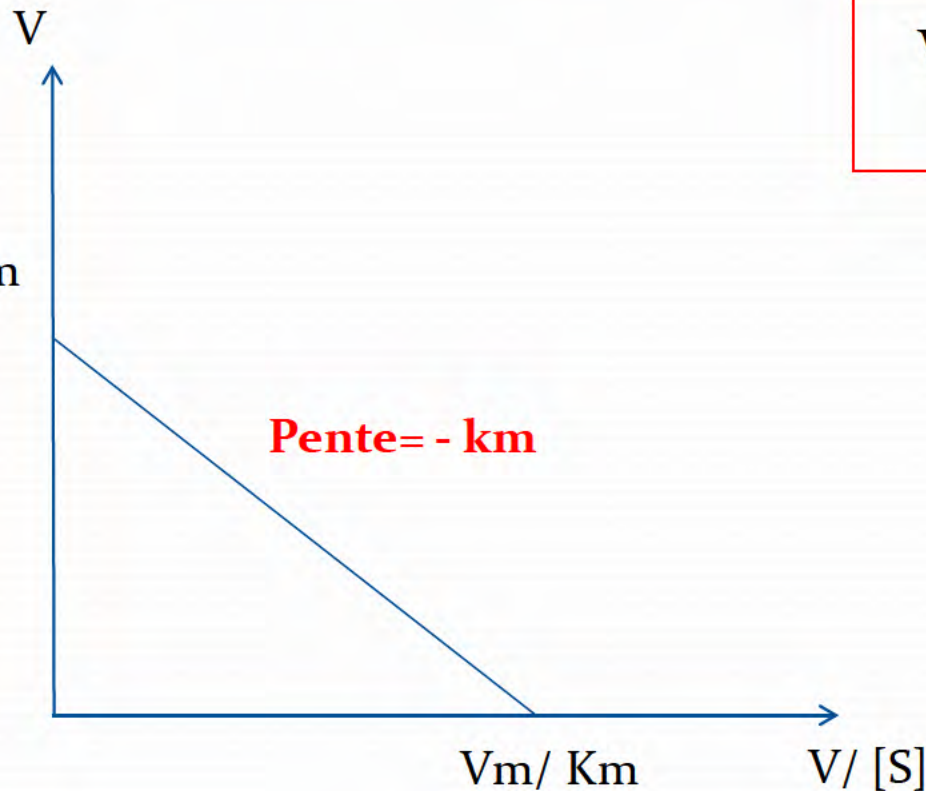
2- Méthode graphique de Line weaver et Burk:



$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_m}$$

Méthode de détermination de la constante de Michaelis

2- Méthode graphique d'Eadie Hofstee:



$$V = V_m - K_m \frac{V}{[S]}$$

Définition des unités enzymatiques

Unité internationale:

Quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une **micromole** de substrat par **min**, dans des conditions optimales de mesure

$$\text{UI} = \mu \text{ mol/min} = \text{Activité enzymatique} = V_{\text{max}} \\ \text{UI/ unité de volume}$$

Katal: Quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une **mole** de substrat par **seconde**.

Définition des unités enzymatiques

Activité spécifique:

Nombre de molécules de substrat transformées par **min** et par **milligramme** d'enzyme

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\text{mg de protéine}} = \frac{\text{UI}}{\text{mg de protéine}}$$

Mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique

Définition des unités enzymatiques

Activité spécifique moléculaire:

Nombre de molécules de substrat transformées par **min**
et par **molécule** d'enzyme

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\mu \text{ mol de protéine}} = \frac{\text{UI}}{\mu \text{ mol de protéine}}$$

Détermination de l'activité enzymatique

En cinétique:

$$D_o = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad C = D_o \cdot 1 / \varepsilon \cdot 1 / l$$

$$\text{Activité enzymatique en UI/l} = \Delta D_o / \Delta t \cdot 1 / \varepsilon \cdot 1 / l \cdot V_t / V_e \cdot 10^6$$

Δt : temps de mesure en min

ε : coefficient d'absorption molaire ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l : trajet optique

V_t : volume du mélange réactionnel total ou se fait la mesure

V_e : volume du milieu contenant l'enzyme à doser

Influence Des agents physiques et chimiques sur la cinétique

Influence des agents physiques

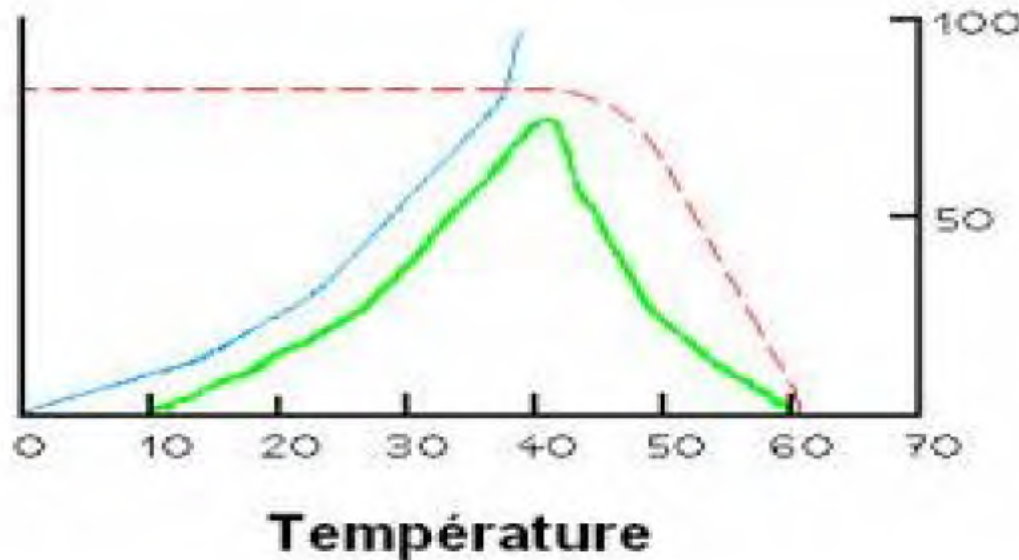
1- Influence de la température:

2 effets sur la réaction enzymatique:

- ✓ Elle **accélère** la réaction en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation.
- ✓ Une température élevée fragilise les liaisons et rend la structure tertiaire instable, avec dénaturation la protéine
⇒ Il y aura **diminution** de l'activité catalytique

Influence des agents physiques

1- Influence de la température:



- L'activité enzymatique augmente avec l'augmentation de la température la T (l'interaction entre l'enzyme et son substrat devient plus importante à forte température).
- A très fortes températures la protéine se dénature et perd donc son activité enzymatique.

Influence des agents physiques

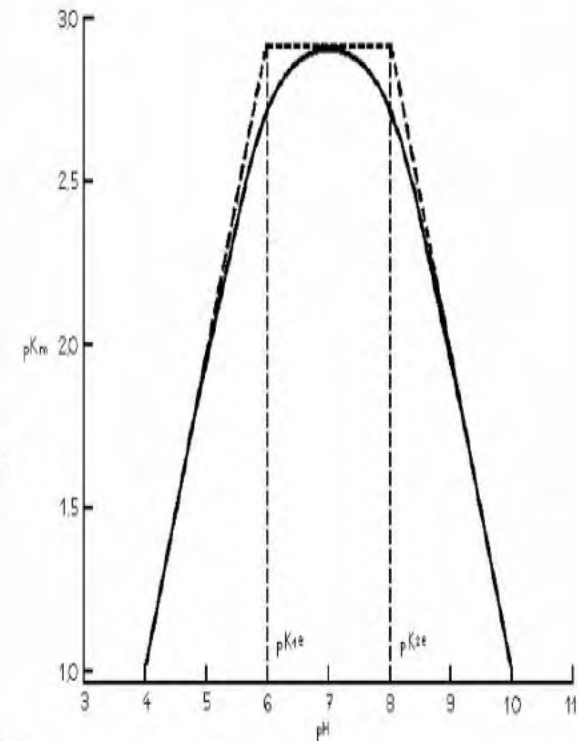
1- Influence de la température:

- L'activité enzymatique augmente jusqu'à une **température optimale** puis diminue pour atteindre une activité nulle à de grandes températures.
- A la température optimale l'activité enzymatique est **la plus importante**.
- Cette température optimale **varie d'une enzyme à un autre**.

Influence des agents physiques

2- Influence du pH:

- ✓ aux valeurs extrêmes:
il dénature la protéine en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés
- ✓ aux valeurs intermédiaires:
il influe sur l'activité en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés du site actif et du substrat



Influence des agents physiques

3- Force ionique:

La présence d'ions dans le milieu réactionnel joue un rôle important:

- Certaines enzymes nécessitent des **activateurs** (ions métallique).
- Solubilité maximale pour une **concentration faible** en sels neutres.

Influence des agents physiques

4- Effet des radiations:

Les émissions radioactives α , β , γ , rayons X, et les neutrons
Peuvent directement ou indirectement entraîner
l'inactivation des enzymes:

➤ Effet Direct:

Ionisation des molécule

➤ Effet Indirect:

Ionisation du milieu réactionnel

Formation de radicaux libres qui attaquent les enzymes

Influence des agents chimiques

Définition d'un effecteur:

Est tout corps chimique, minéral ou organique capable de **modifier la cinétique** des réactions enzymatiques

Il peut être soit **activateur** ou **inhibiteur**

Activateurs enzymatiques

Définition:

Est tout agent chimique, qui par sa liaison
avec l'enzyme
accélère
la vitesse de la réaction enzymatique

Activateurs enzymatiques

1- Ions métalliques:

- Se fixent par coordinance à des atomes d'oxygène du groupement COOH ou d'azote du groupement NH₂ des enzymes
- Ils confèrent une grande stabilité dans le site actif de l'enzyme
- L'ion métallique favorise:
 - Une bonne conformation de l'enzyme
 - La fixation du substrat
 - Participe à la catalyse

Exemple: Kinases activées par Mg⁺²

Activateurs enzymatiques

2- Activation des pro-enzymes inactifs:

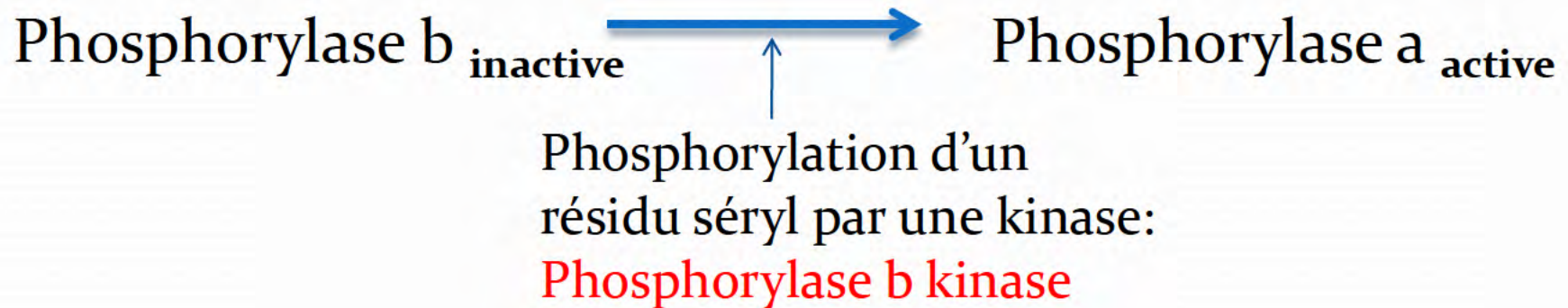
- La plupart des enzymes protéolytiques sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs,
- L'élimination d'une séquence d'acides aminés le rend actif

Trypsinogène \longrightarrow Trypsine + Hexapeptide

Activateurs enzymatiques

3- Activation par fixation covalente d'un groupement chimique:

Par addition d'un groupement chimique, le plus souvent le phosphate



Les inhibiteurs enzymatiques

Définition:

Est tout effecteur, qui par sa liaison
avec l'enzyme

ralentit

la vitesse de la réaction enzymatique

Intérêt:

- Mécanisme essentiel de contrôle des systèmes biologiques
- Source d'information sur le mécanisme d'action des enzymes

Les inhibiteurs enzymatiques

1- Les inhibiteurs irréversibles:

- Se lient de façon **irréversible** avec l'enzyme
- Agissent brutalement en dénaturant l'enzyme

Exemple: 5Fluoro-uracile utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse

Inhibe la **thymidilate synthase**; enzyme qui intervient dans la synthèse de la thymine (ADN) → Arrêt de la multiplication des cellules tumorales.

Les inhibiteurs enzymatiques

2- Les inhibiteurs réversibles:

- Perturbent la cinétique et peuvent stopper la réaction
- **L'inhibition peut être levée** dans des conditions réactionnelles particulières

Ont un grand intérêt puisqu'ils permettent une étude très fine des mécanismes moléculaire de la catalyse.

Les inhibiteurs réversibles

a- Les inhibiteurs compétitifs:

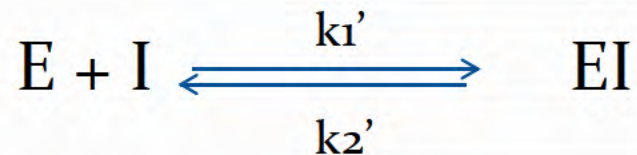
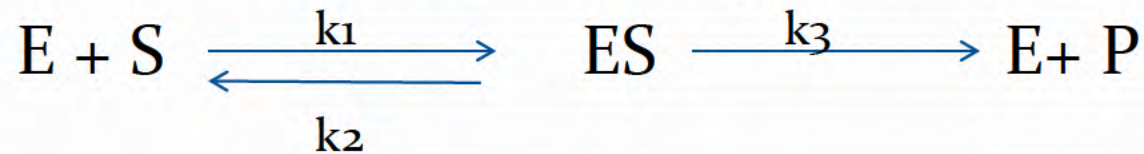
- Comportent une **analogie structurale** avec le substrat
- Entre en **compétition** avec les molécules de substrat pour se lier au site actif
- Se lie de façon **réversible**

Diminue la vitesse de catalyse en **abaissant la proportion de molécules d'enzyme** liées au substrat

- A concentration élevée en substrat, le substrat entre en compétition avec les molécules inhibitrices pour se lier au SA, et les déplaçés des centres catalytique

Les inhibiteurs réversibles

a- Les inhibiteurs compétitifs:



$$V_{app} [ES] = V_{disp} [ES] \quad \frac{K_2 + K_3}{K_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = K_m$$

$$V_{app} [EI] = V_{disp} [EI] \quad \frac{K_2'}{K_1'} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} = K_i$$

Les inhibiteurs réversibles

a- Les inhibiteurs compétitifs:

$$[EI] = \frac{[E] \cdot [I]}{K_i} = \frac{[ES] \cdot K_m}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i} = \frac{[ES] \cdot [I] \cdot K_m}{[S] \cdot K_i}$$

$$[Et] = [E] + [EI] + [ES]$$

$$= \frac{[ES] \cdot K_m}{[S]} + \frac{[ES] \cdot [I] \cdot K_m}{[S] \cdot K_i} + [ES]$$

$$= [ES] \cdot \left[1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[I] \cdot K_m}{[S] \cdot K_i} \right]$$

$$[Et] = [ES] \cdot \left[1 + \frac{K_m}{[S]} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \right]$$

Les inhibiteurs réversibles

$$V = K_3 \cdot [ES] / V_{\max} = K_3 \cdot [E_t] \implies K_3 = \frac{V_{\max}}{[E_t]}$$

$$V = \frac{V_{\max} [ES]}{\left[1 + \frac{K_m}{[S]} \cdot \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \right] [ES]} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m \cdot \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right]}$$

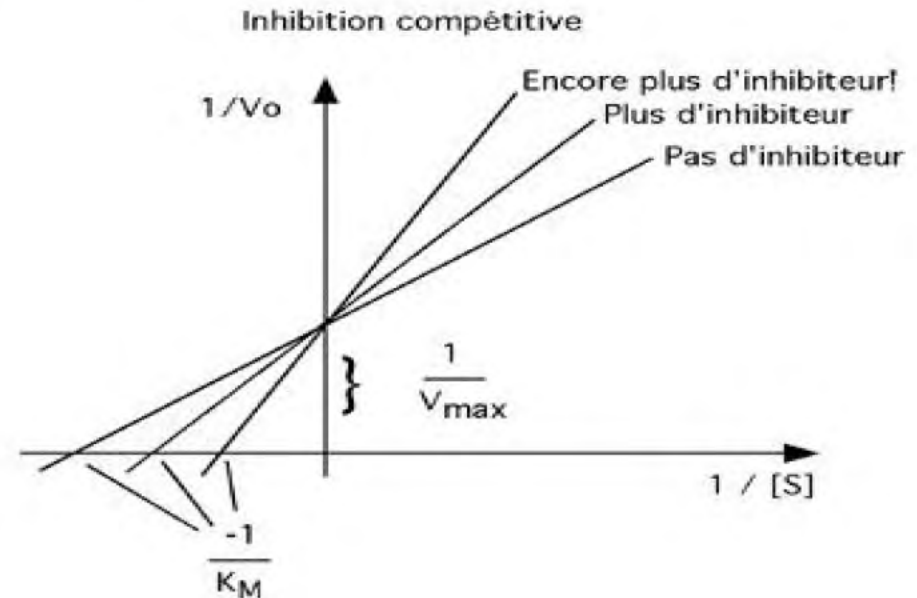
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Les inhibiteurs réversibles

a- Les inhibiteurs compétitifs:

Pente de la droite est
multipliée par un facteur :
 $1 + [I]/K_i$

V max non modifiée



La constante de Michaelis est augmentée:

Dissociation de ES est favorisée

L'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue

Les inhibiteurs réversibles

b- Les inhibiteurs non compétitifs:

- Se lie de façon **réversible** à un site **autre que le site actif**
- Il provoque une **modification de la conformation** de l'enz
- L'enzyme peut se lier:
 - a l'inhibiteur seul
 - au substrat seul
 - à l'inhibiteur et au substrat à la fois
- L'enzyme est inactivée quand l'inhibiteur est lié, en présence ou non du substrat.
- L'effet de l'inhibiteur n'est pas **inversé par l'augmentation de la concentration en substrat**

Les inhibiteurs réversibles

b- Les inhibiteurs non compétitifs:

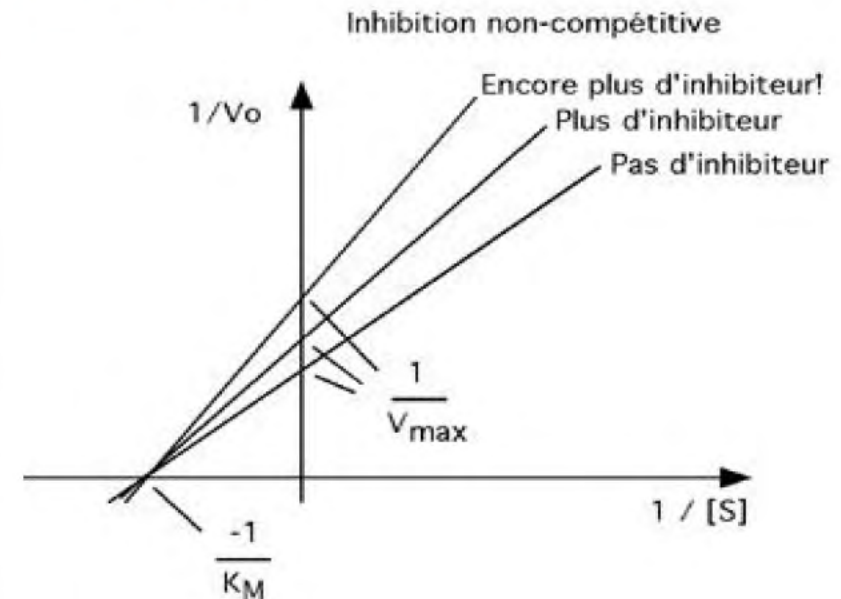
L'inhibiteur diminue
la concentration de l'enzyme active
En
Abaissant la vitesse maximale

Les inhibiteurs réversibles

b- Les inhibiteurs non compétitifs:

K_m inchangée

V_{max} est abaissée



$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Les inhibiteurs réversibles

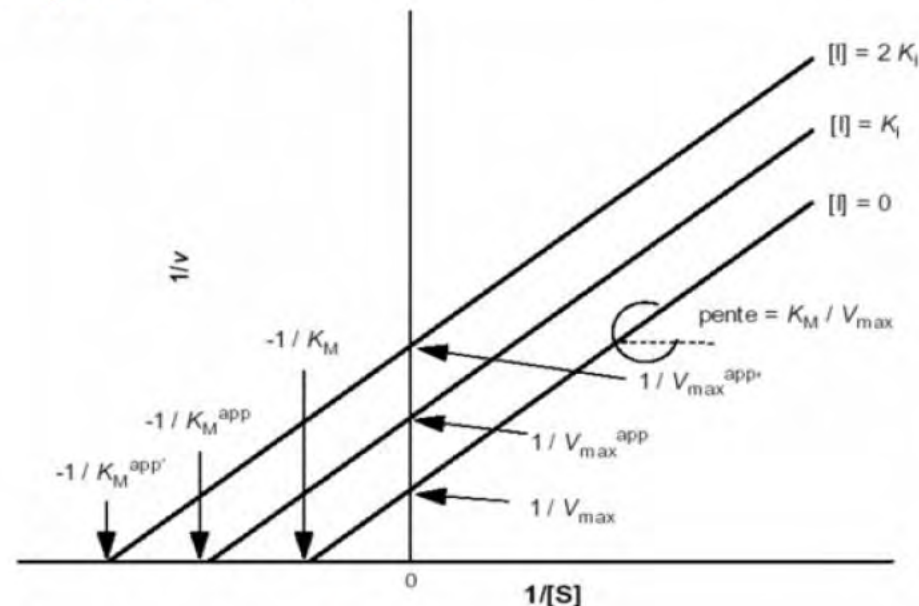
c- Les inhibiteurs incompétitifs:

- L'inhibiteur ne se lie pas à l'enzyme libre, mais uniquement au **complexe ES**

Pente non modifiée

K_m \nearrow

V_{max} \searrow



$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Cinétique enzymatique à Deux substrats

Introduction

L'étude des mécanismes à 2 substrats, se fait par la généralisation des notions établies pour les réactions à 1 substrat.

Les enzymes adoptant ce model cinétique catalysent généralement un transfert de groupement G



- | | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| - GX : 1 ^{er} substrat | - X: 1 ^{er} produit |
| - Y: 2 ^e substrat | - GY : 2 ^e produit |

Introduction

Cette cinétique à 2 substrats implique différents mécanismes, qui peuvent être:

- Séquentiels :
 - Ordonnés
 - Aléatoires
- Ping pong

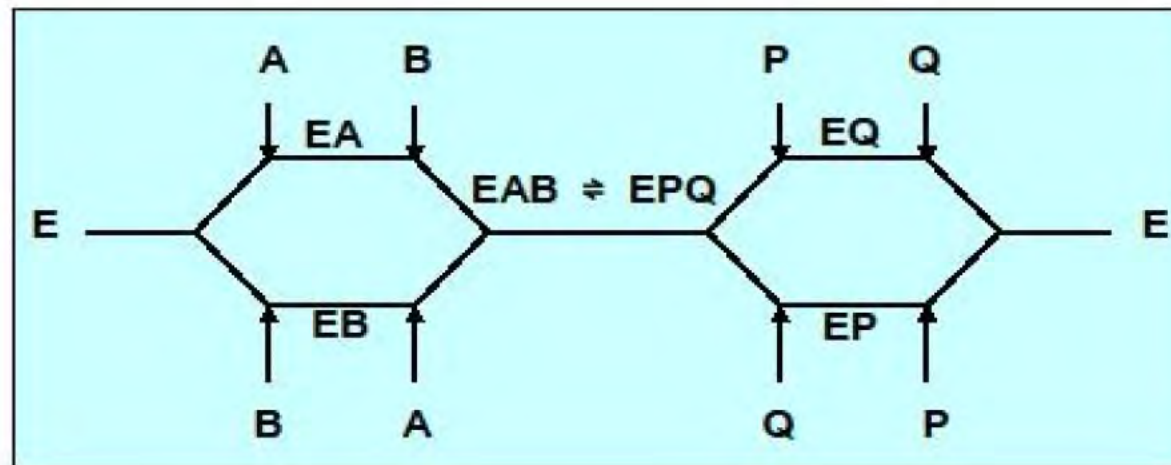
Mécanisme séquentiel

(à complexe ternaire/ à transfert simple)

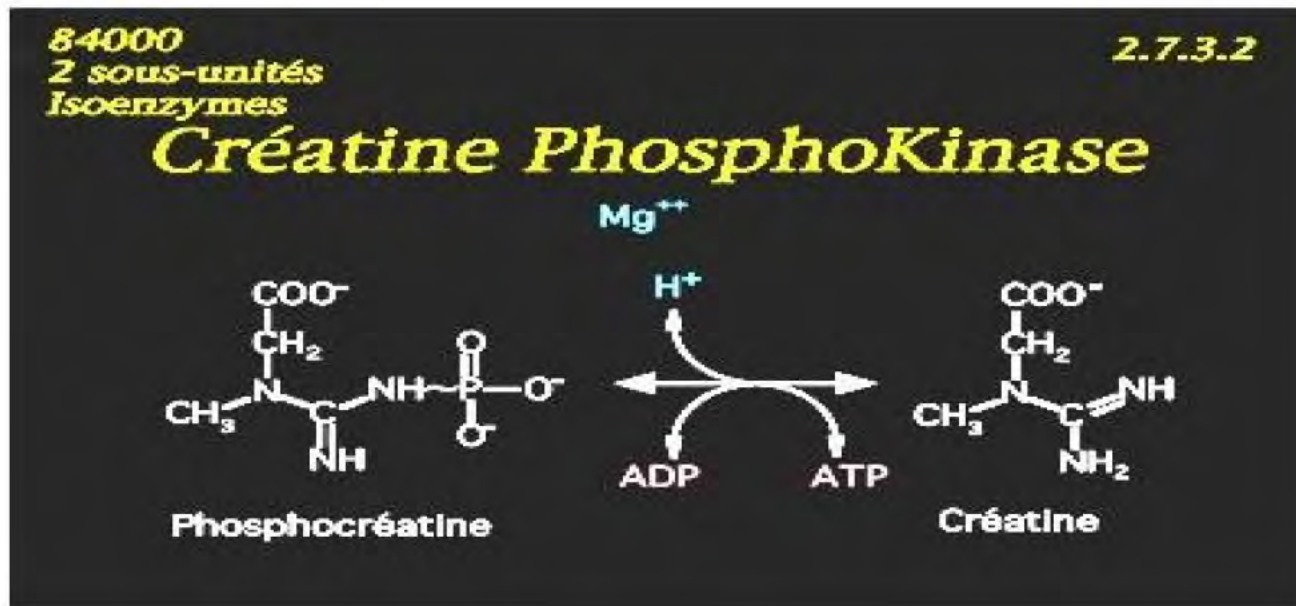
- Appellation due à la formation d'un complexe ternaire:
[**Enzyme**-**1^{er} Substrat** -**2eme Substrat**] (**E-GX-Y**)
- La réaction est dite à **transfert simple**, car le groupement passe du **substrat donneur (GX)** au **substrat accepteur (Y)**.
- Dans ces réactions **tous les substrats doivent se fixer sur l'enzyme**, avant qu'aucun produit ne soit libéré.
- Selon l'existence d'un **ordre précis** de fixation des substrats, ou de libération des produits, on distingue 2 mécanismes:
 - Bi-Bi aléatoire
 - Bi-Bi ordonné

Réaction type Bi-Bi aléatoire

Aucun ordre n'est observé dans ce type de mécanismes, la **fixation des substrats se fera aléatoirement**, il en est de même pour la **libération des produits**.




Réaction type Bi-Bi aléatoire

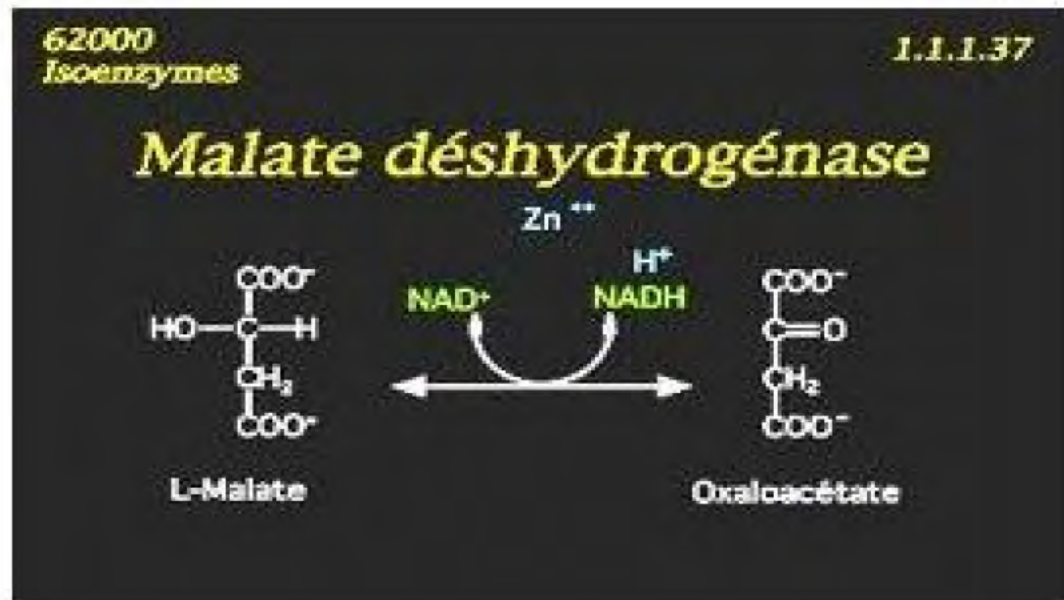


- Catalyse le transfert d'un radical phosphoryl du substrat: **phospho-créatine**, vers l' **ADP** (co-enzyme transporteur)
- L'affinité de l'enzyme pour ces 2 substrats étant voisine

Réaction type Bi-Bi ordonné

- Il y a fixation de
 - 1- Substrat A
 - 2- Puis Substrat BDonnant naissance à EAB
- La suite de la réaction conduit à la libération de
 - 1- 1^{er} Produit P(Issu de B)
 - 2- ensuite 2nd Produit Q (Issu de A)

Réaction type Bi-Bi ordonné



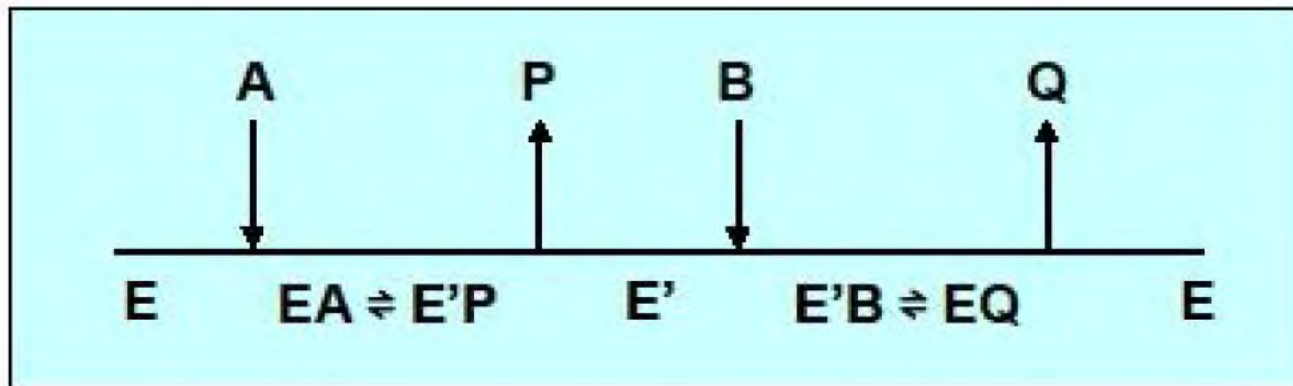
L'enzyme n'a pas d'affinité pour le malate, si elle n'est pas préalablement associée au NAD^+ (co-enzyme)

Réaction type Ping-pong

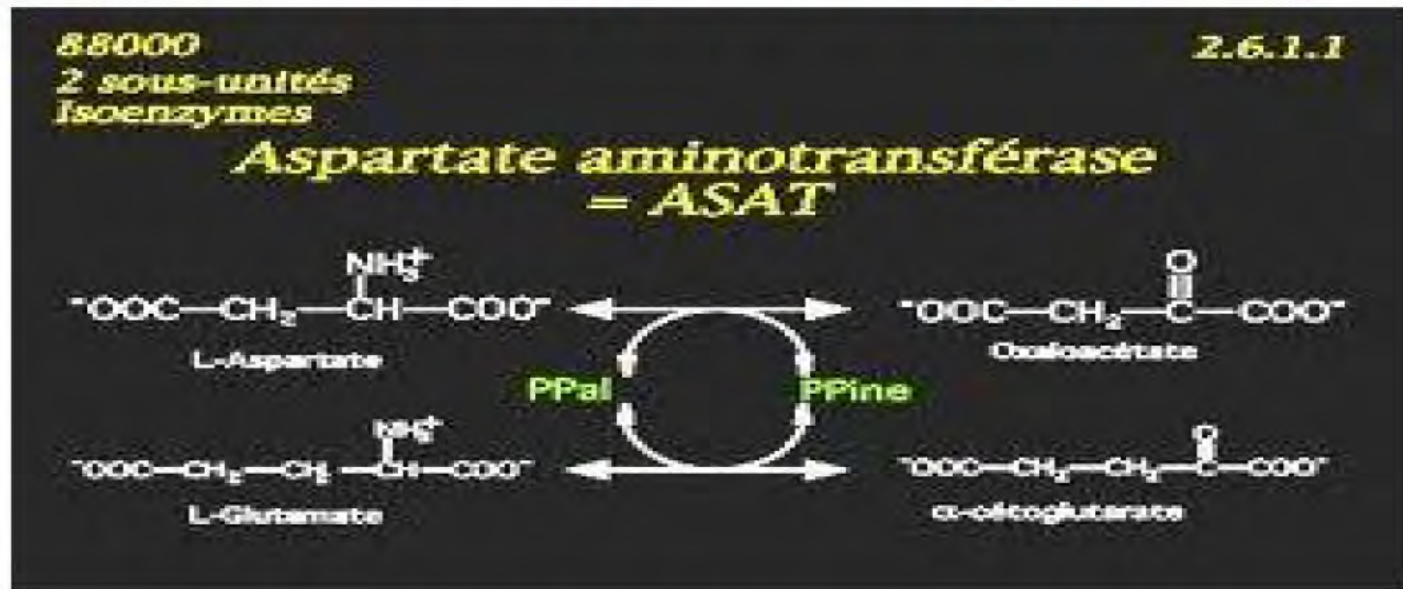
(à complexe binaire)

Un ou plusieurs produits sont libérés par l'enzyme, avant que tous les substrats ne soient fixés .

Il y a formation d'un **complexe binaire**



Réaction type Ping-pong



1- Fixation du 1^{er} Substrat: L-Aspartate

- Départ du ($-\text{NH}_2$) et sa fixation du PLP (co-enzyme) qui se transforme en phosphate de pyridoxamine

2- Libération du 1^{er} Produit: Oxalo-acétate

3- Fixation du 2^{ème} substrat: α céto-glutarate

- Transfert du groupement ($-\text{NH}_2$) du phosphate de pyridoxamine vers l' α -céto-glutarate

4- Libération du 2^{ème} produit: L-glutamate

Enzymes Allostériques

Introduction

Régulation de l'activité enzymatique

Conditions locales

T, pH
[S], co-facteurs
Activateurs
Inhibiteurs

Modification structurale de l'E

**Modification
covalente**

Irréversible
Activation
des pro-enzymes

**Modification
non-covalente**

Réversible
Phosphorylation

Définitions

Allostérie:

- Propriété de certaines protéines actives, qui peuvent **changer de conformation**, lorsqu'elles se lient à un **effecteur allostérique** en un **site différent du site actif**.
- Cette liaison se traduit par une **modification de l'activité**.

Régulation allostérique:

Mécanisme de **modulation de l'activité de certaines enzymes**, employé par la cellule pour **contrôler le flux global d'une voie métabolique**.

Définitions

- Enzymes allostérique :
 - Sont des **oligomères**, formés par **plusieurs sous unités** appelées: **Protomères**
 - Ont une **structure quaternaire**
- Ils contiennent :
 - Plusieurs sites actifs identiques
 - Plusieurs sites allostériques identiques

Définitions

Cette régulation est définie par:

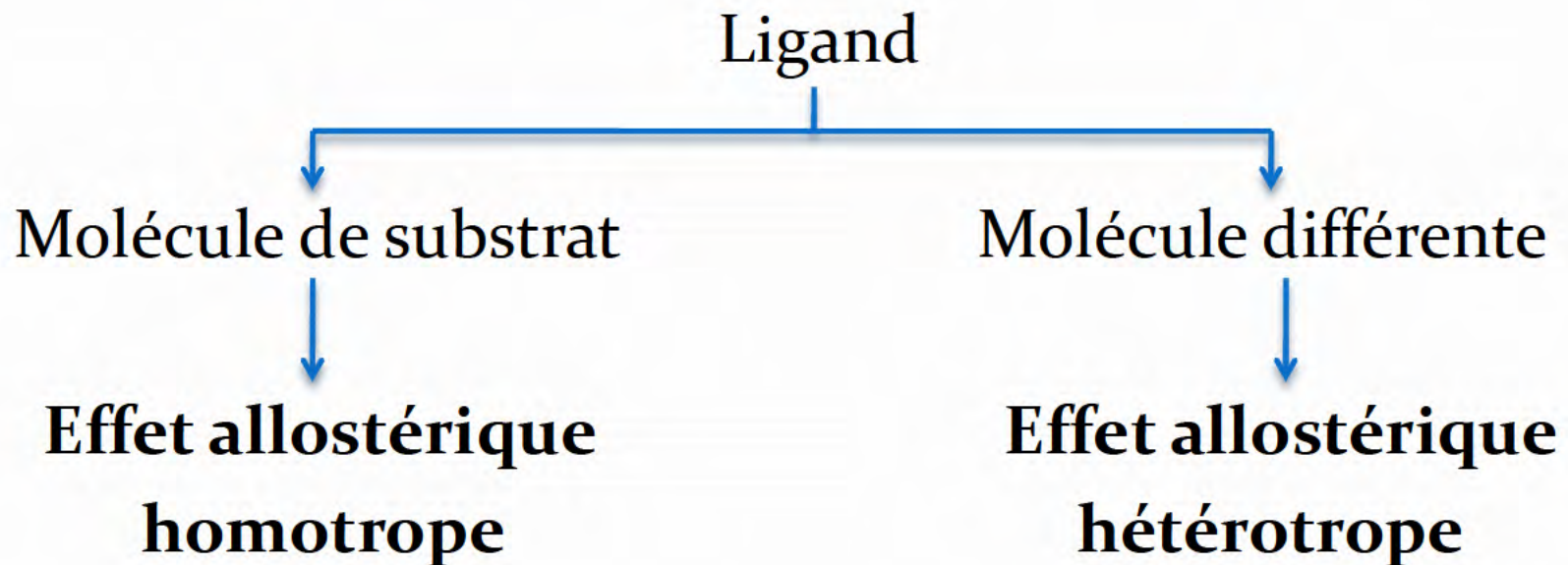
1- L'effet allostérique:

L'effets allostérique résulte des interactions indirectes entre sites de fixation distincts.

Définitions

2- Les effecteurs allostériques:

Sont des ligands dont le site de fixation est différent du site de fixation du substrat



Définitions

2- Les effecteurs allostériques (suite):

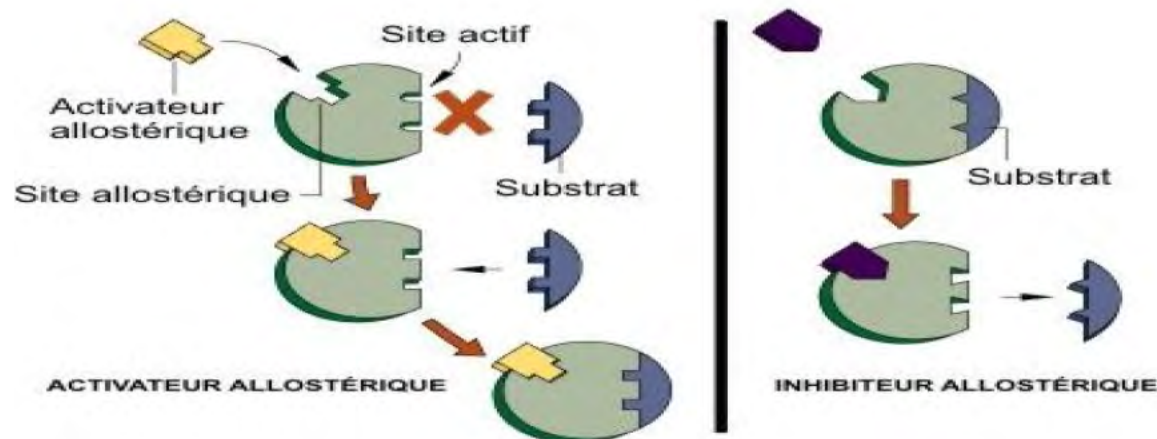
- Dans un système multi-enzymatique, l'enzyme clé (catalysant l'étape d'engagement d'une voie métabolique) est inhibée par le produit final de cette voie= Rétro-contrôle

Définitions

3- La transition allostérique:

Enzyme allostérique: structure protéique avec au moins 2 sites fonctionnels

- Site actif: Substrat
- Site allostérique: Effecteur allostérique



Définitions

3- La transition allostérique (suite):

Fixation de l'effecteur allostérique



Modification structurale discrète réversible au niveau de l'enzyme: **Transition allostérique**



Modification de la conformation du SA



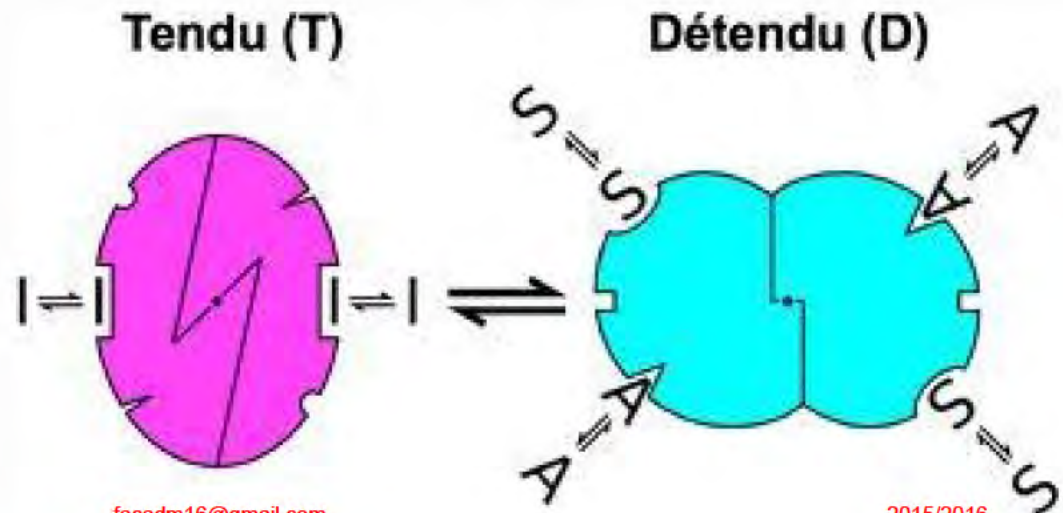
Modification de l'activité de l'enzyme

Définitions

3- La transition allostérique (suite):

- Modification des **forces de liaisons** qui associent les sous unités entre elles, mais **sans aller jusqu'à leur dissociation**
- La molécule apparait soit dans un état **Tendu** ou **relâché**, qui diffère par leur **affinité au substrat**

T: Faible affinité pour S
R: Forte affinité pour S



Définitions

4- La coopérativité:

- L'enzyme allostérique contient:
 - Plusieurs sites actifs identiques
 - Plusieurs sites allostériques identiques
- Ces sites n'agissent pas de façon indépendante l'un par rapport à l'autre, mais au contraire ils montrent une coopérativité.
- La coopérativité ➡ la fixation d'un effecteur allostérique sur l'enzyme , influe sur la fixation du substrat.

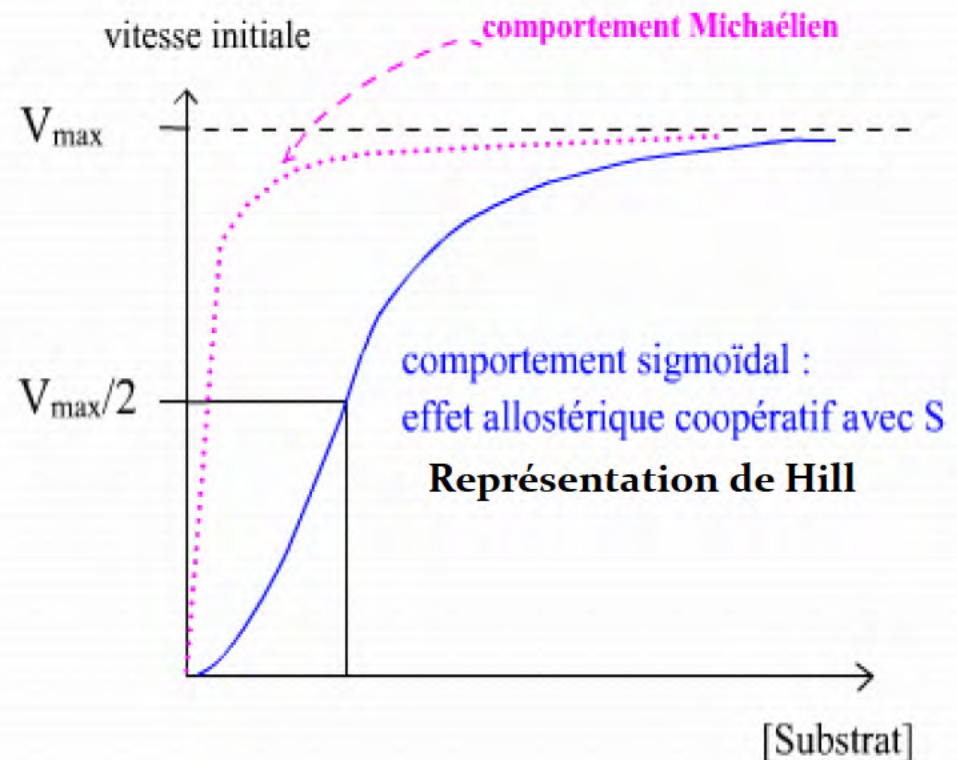
Cinétique des enzymes allostériques

Courbe sigmoïde

$$V = \frac{V_m \cdot [S]^n}{K_{1/2} + [S]^n}$$

$$V = V_{max}/2 \quad K_{1/2} = [S]$$

n: nombre de site de
liaison de substrat



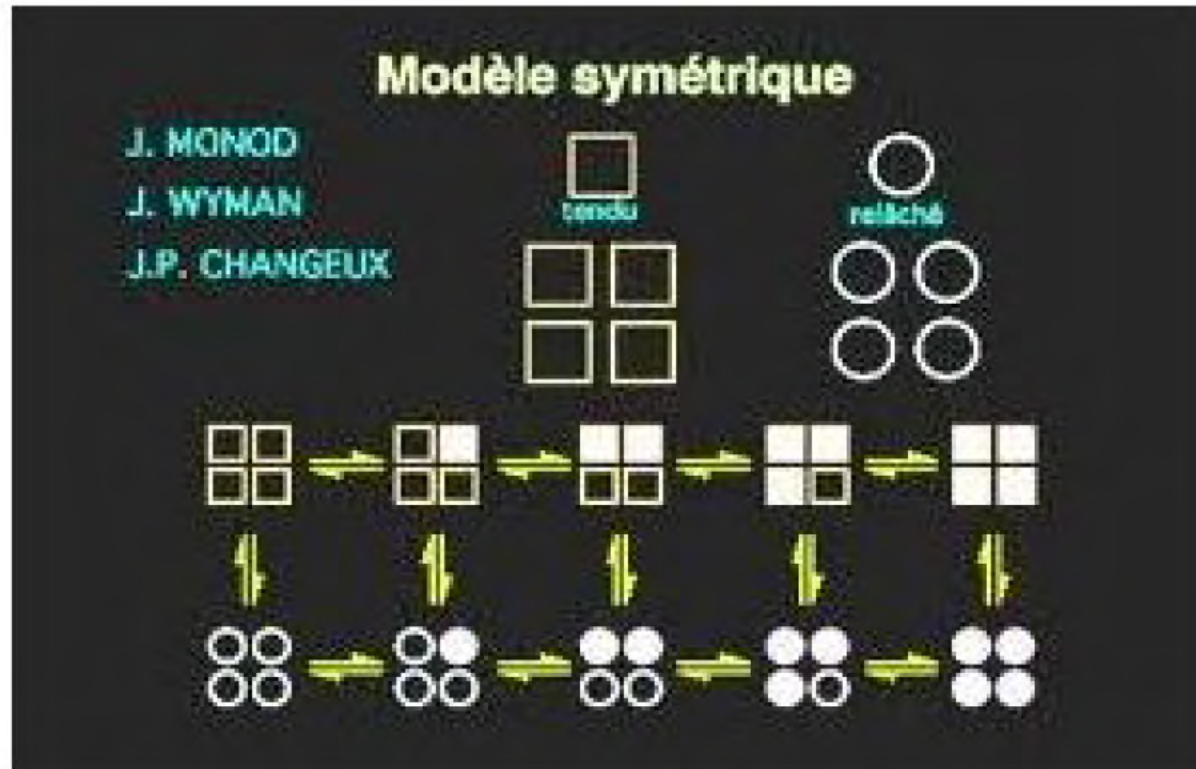
Cinétique des enzymes allostériques

2 modèles sont décrits:

1- **Modèle symétrique = concerté :**

- Toutes sous unités sont soit en conformation T (absence du substrat), soit en conformation R (en présence du substrat)
- Chaque molécule de substrat qui se lie augmente la probabilité de transition de la forme inactive à la forme active

Cinétique des enzymes allostériques



Cinétique des enzymes allostériques

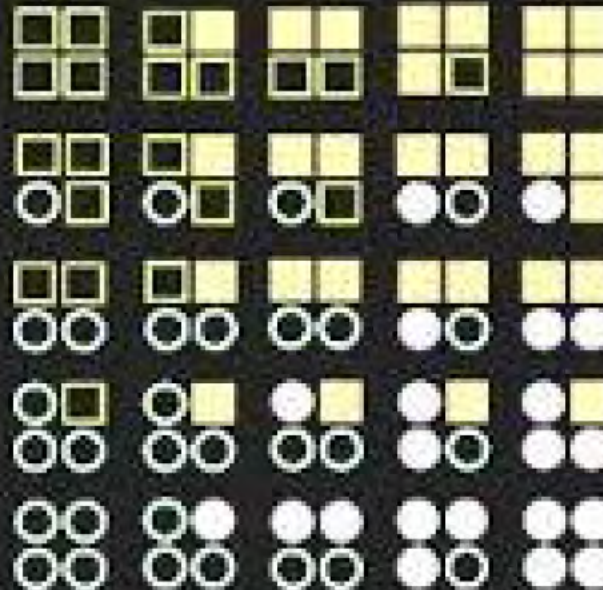
2- Modèle séquentiel:

- Contrairement au model précédent ou la transition $T \leftrightarrow R$ se fait en bloc ,Il y a 2 conformation, mais les sous unités passent de la forme inactive à la forme active individuellement
- La fixation de la molécule de substrat, induit la transition de la première s/u, ce qui facilite la transition de la s/u voisine et ainsi de suite

Cinétique des enzymes allostériques

Modèle non symétrique

D.E. KOSHLAND



Les iso- enzymes

Définition

- Les iso-enzymes sont des **formes différentes** d'une enzyme, catalysant la **même réaction biochimique**.
- **Variété moléculaire** d'une même enzyme.
- Possèdent une **activité catalytique identique** (catalysant la même réaction biochimique).
- **Diffèrent** par certaines de leurs propriétés:
 - Physico-chimiques (pH, mobilité électrophorétique, T).
 - Cinétique (K_m , V_{max}).
 - Sensibilité à certains effecteurs (activateurs, inhibiteurs).

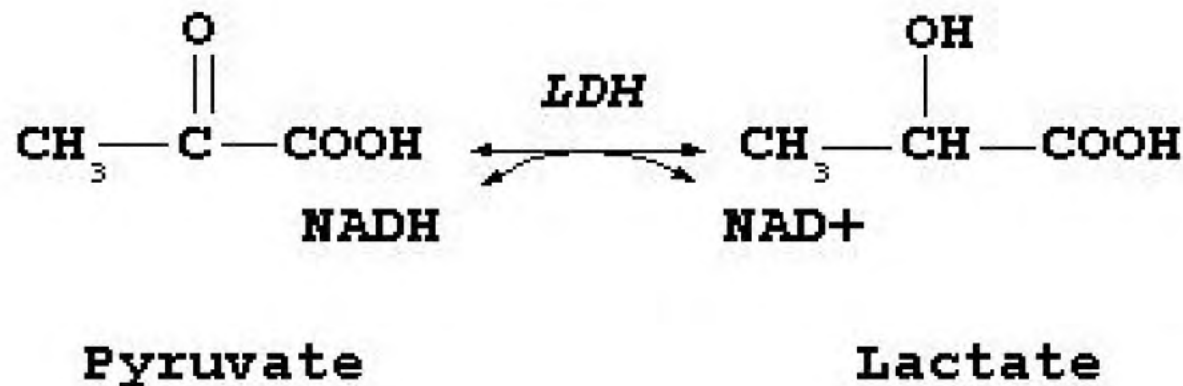
Définition

- Cette différence est due à des variations au niveau de leur structures primaires (Séquence en Acides aminés similaires mais non identique)
- Possède une répartition différente dans l'organisme

Exemple d'iso-enzymes

LDH: Lactate déshydrogénase

Enzyme cytoplasmique présente dans de nombreux tissus



LDH

Structure:

Tétramérique: association de 2 types de chaines peptidiques

- M :muscle
- H: Cœur

5 iso-enzymes:

- LDH₁ (H₄): Cœur
- LDH₂ (H₃M₁): érythrocytes
- LDH₃ (H₂M₂): Leucocytes, rate , et ganglions
- LDH₄ (H₁M₃): muscle utérin, poumon
- LDH₅ (M₄): Foie

Rôle

La mesure de l'activité d'une iso-enzyme renseigne sur l'état du tissu dont elle est spécifique

Application De L'enzymologie

Applications diagnostiques et Pronostiques

Enzymes	Localisation	Pathologies
ASAT, ALAT	Sérique	Hépatites virales
PAL	Sérique	Affections osseuses, hépatiques
Lipase, amylase	Sérique	Pancréatites
CKMB	Sérique	Infarctus du myocarde
Hexosaminidases	Leucocytes	Tay sachs
G6PD	Érythrocyte	Déficit héréditaire en G6PD

Application industrielle

- Evaluer la qualité des aliments.
- Vérification des processus de stérilisation et de pasteurisation.
- Synthèse d'hormones, et de médicaments.

Application thérapeutique

- Utilisation des anti-métabolites en chimiothérapie anti-cancéreuse (5 FU)

Application génétique

- Utilisation des enzymes pour les réactions d'amplification in vitro
- Utilisation des enzymes de restriction pour le diagnostic de certaines maladies génétiques